

PCT

WELTOGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>4</sup>:</p> <p>C12N 15/00, A61K 39/29 C12Q 1/68, G01N 33/576</p>		A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 88/06184</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. August 1988 (25.08.88)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP88/00123</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 19. Februar 1988 (19.02.88)</p> <p>(31) Prioritätsaktenzeichen: P 37 05 512.7 P 37 44 242.2</p> <p>(32) Prioritätsdaten: 20. Februar 1987 (20.02.87) 24. Dezember 1987 (24.12.87)</p> <p>(33) Prioritätsland: DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: SEELIG, Renate [DE/DE]; SEELIG, Hans, Peter [DE/DE]; BURCKHARDT, Je- an [CH/DE]; Kriegsstr. 99, D-7500 Karlsruhe (DE).</p> <p>(74) Anwalt: DEUFEL, SCHÖN, HERTEL, LEWALD, OT- TO; Postfach 26 02 47, D-8000 München 26 (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, DK, FI, JP, KR, NO, SU, US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>	
<p>(54) Title: VIRAL ANTIGEN, PROCESS FOR ITS PRODUCTION, AND APPLICATION IN DIAGNOSIS AND THERAPY (VACCINE)</p> <p>(54) Bezeichnung: VIRUSANTIGEN, VERFAHREN ZU SEINER GEWINNUNG UND ANWENDUNG IN DIAGNOSE UND THERAPIE (IMPFSTOFF)</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A DNA of approximately 5 KB, associated with non-A,non-B hepatitis, process for the production of same according to known methods, and application of said DNA or of fragments of same in the diagnosis of non-A,non-B hepatitis, as well as in the synthesis of proteins for the generation of immunological reagents to detect non-A,non-B hepatitis or to produce vaccines. The DNA and fragments of same can be cloned and also be introduced into appropriate vectors, in order to obtain viral expression products.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Eine Non-A,Non-B-Hepatitis assoziierte DNA von etwa 5 KB, ein Verfahren zur Herstellung derselben nach an sich bekannten Methoden und die Verwendung dieser DNA oder von Fragmenten davon zur Diagnose von Non-A,Non-B-Hepatitis sowie zur Synthese von Proteinen zur Erzeugung von immunologischen Reagenzien für den Nachweis von Non-A,Non-B-Hepatitis oder zur Erzeugung von Vaccinen. Die DNA und Fragmente derselben können geklont und auch in geeignete Vektoren eingesetzt werden, um Virusexpressionsprodukte zu liefern.</p>			

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

**Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.**

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabun	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungarn	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	IT	Italien	RO	Rumänien
BJ	Benin	JP	Japan	SD	Sudan
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
FI	Finnland	ML	Mali		

Virusantigen, Verfahren zu seiner Gewinnung und Anwendung  
in Diagnose und Therapie (Impfstoff)

1 Non-A, Non-B-Hepatitis-erkrankungen sind in der Literatur ausführlich und zahlreich beschrieben. Ebenso bekannt sind aber die Schwierigkeiten der Erfassung des NANBH-Virus und Nachweis der Krankheit.

5 Es wurden nun aus dem Stuhl von Non-A, Non-B-Hepatitis-patienten Partikel isoliert und bezüglich ihres Molekulargewichts und ihrer Beschaffenheit charakterisiert sowie ein Nachweisverfahren auf das Vorhanden sein solcher Partikel gefunden und der Nachweis dieser Partikel zur Diagnose des Vorliegens einer Non-A, Non-B-Hepatitis bei leberkranken Patienten angewandt.

10 Aus den aus dem Stuhl isolierten Partikeln wurde DNA isoliert und nach herkömmlichen Methoden kloniert. Die so erhaltenen klonierten DNA-Stränge wurden zum Nachweis des Vorliegens homologer oder sehr ähnlicher DNA wiederum im Stuhl, Serum, Lebergewebe und Körperflüssigkeiten von leberkranken Patienten verwendet, bei denen auf diesem Wege eine Non-A, Non-B-Hepatitis mit hinreichender Wahrscheinlichkeit diagnostiziert werden kann.

15 Die Erfindung betrifft also zusammengefaßt die Isolierung Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierte Partikel, deren DNA sowie das Klonieren von DNA und die Verwendung sowohl dieser Partikel als auch der erhaltenen DNA-Klone zur Eingrenzung von Leber-erkrankungen auf das Vorliegen einer Non-A, Non-B-Hepatitis. Weitere Aspekte der Erfindung liegen 20 in der Entwicklung von erweiterten Nachweisverfahren und schließlich auch Impfstoffen auf Basis der zu erhaltenen Antikörper und durch Synthese synthetischer Peptide mit 25 der Sequenz der Partikel, die diesen Virusproteinen entspricht und die sich aus der Sequenz der klonierten DNA vorhersagen läßt.

30 35 Aus den Stuhlproben Non-A, Non-B-Hepatitis erkrankter Patienten wurde eine Substanz isoliert, die sich signifikant ge-

-2-

- 1 häuft im Stuhl solcher Non-A- Non-B-Hepatitis-Patienten findet, dagegen bei gesunden, sowie bei Patienten mit Lebererkrankungen anderer Genese in signifikant geringerem Ausmaß findet. Ein Verfahren zum Nachweis dieser Substanz wurde entwickelt, worin Polystyrolbeads mit verdünntem Serum von Non-A, Non-B-Hepatitis-Rekonvaleszenten beschichtet werden. Die gewaschenen beads werden dann mit einer 10 %-igen Stuhlsuspension eines zu untersuchenden Probanden inkubiert, wobei evtl. vorhandene Non-A -Non-B-Hepatitis assoziierte Substanz an die in dem Rekonvaleszentenserum enthaltenen, an die Polystyrolkugeln gebundenen Antikörper gegen diese Substanz bindet und so immobilisiert wird. Die Bindung der Non-A, Non-B-Hepatitis assoziierten Teilchen kann nachgewiesen werden durch Bindung von menschlichem IgG wiederum aus Rekonvaleszentenserum von Non-A- Non-B-Hepatitis-Patienten, das mit Jod 125 radioaktiv markiert ist. Bei Vorliegen der Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierten Substanz im Stuhl des Probanden wird radioaktives Immunglobulin an diese gebunden und das entsprechende Signal zum Nachweis verwendet.
- 10
- 15
- 20
- Bei Verwendung dieses Nachweisverfahrens für die Hepatitis-Non-A- Non-B-assoziierte Substanz in großen Kollektiven von Patienten mit Lebererkrankungen unterschiedlicher Genese zeigte es sich, daß diese Substanz hochsignifikant gehäuft bei Patienten mit gesicherter Hepatitis Non-A, Non-B im Stuhl nachweisbar ist (s. Tabelle 1). Bei Patienten mit anderen Lebererkrankungen, bei denen eine Non-A, Non-B-Hepatitis eher unwahrscheinlich ist, die teilweise in ihrem klinischen Bild jedoch einer akuten oder abgelaufenen Non-A, Non-B-Hepatitis ähneln können, insbesondere auch bei Patienten mit einer akuten unabgelaufenen Hepatitis A oder B fand sich dagegen nur in äußerst wenigen Fällen die Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierte Substanz (s. Tabellen 2 und 3). Hieraus ergibt sich, daß das Vorliegen dieser Substanz einen deutlichen Hinweis auf die Ätiologie einer zunächst unbe-
- 25
- 30
- 35

- 3 -

- 1 kannten, entzündlichen Lebererkrankung liefern kann, und daß  
der Nachweis dieser Substanz daher eine Untersuchung von ho-  
hen diagnostischem Wert zum Nachweis oder Ausschluß des Vor-  
liegens einer Non-A, Non-B-Hepatitis liefern kann.
- 5 Die mit der Non-A, Non-B assoziierte Substanz weist somit  
eine hohe Affinität gegenüber menschlichen Immunglobulinen  
und Fibronectin sowie dessen nicht kollagenbindenden Spalt-  
produkten auf. Die Bindung an Fab-2-
- 10 Bruchstücke aus dem IgG gesunder und Hepatitis Non-A, Non-B-  
rekonvaleszenter Personen spricht gegen eine unspezifische  
Bindung der assoziierten Substanz an dem Fc-Teil der Immun-  
globuline. Die hohe Affinität gegenüber Fibronectin und dessen  
nicht kollagenbindenden Spaltprodukten ist eine Eigenschaft,  
15 die diese Substanz mit antigenen Proteinen anderer Viren ge-  
meinsam hat (Seelig und Mitarbeiter 1983).  
Behandlung mit organischen Lösungsmitteln (Chloroform, Äther)  
und mit Hitze (70°C, 10 min.) zerstört die Bindungsaffinität  
der Non-A, Non-B assoziierten Substanz nicht. Während die  
20 Verdauung mit Chymotrypsin, Trypsin, Elastase und Neuraminida-  
se keinen Einfluß auf die Bindungseigenschaften der Substanz  
zeigt, führt die Verdauung mit Papain zu einem vollständigen  
und schnellen Verlust der Bindungsaffinität.
- 25 Nach Zentrifugation bei 150.000 g, 2 Std.,  
läßt sie sich im Sediment nachweisen und stellt sich nach  
72-stündiger Laufzeit bei einer Dichte von 1,3 (1,29 - 1,32)  
g/ml Cäsiumchlorid ein. Nach Auftrennung der bei 1,30 g/ml  
Cäsiumchloridbandenden Fraktion über eine Gradienten-Poly-  
30 acrylamidgel-Elektrophorese werden in der Silberfärbung  
mehrere Bande unterschiedlichen Molekulargewichts dargestellt.  
Nach Transfer auf Nitrocellulose lassen sich im Western-Blot  
mit radioaktiv markierten IgG und Fab-2-Fragmenten von Non-A,  
Non-B Hepatitis-Patienten und gesunden Probanden Bande dar-  
stellen, die bei Extraktion gesunder Kontrollstühle nicht  
35 auftreten. Insgesamt werden 4 Banden dargestellt, zwei gut

- 4 -

- 1 sichtbare Hauptbande mit einem geschätzten Molekulargewicht von ca. 64.000 und 56.000 sowie zwei schwächere Bande mit einem geschätzten Molekulargewicht von 51.000 und 43.000. Die Banden mit Fab-2-Bruchstücken sind schwächer und zeigen einen höheren Back-ground. Die Auftrennung von Rohstuhlkonzentraten ohne Cäsiumchlorid-Reinigung nach SDS-Page und Blotting zeigten in positiven Stühlen die beiden Hauptbande mit einem unge-fährten Molekulargewicht um 60.000.
- 10 Bei weiterer Analyse der Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierten Partikel ließ sich DNA isolieren und mit herkömmlichen Metho-den in Fragmenten klonieren. Diese klonierten DNA-Fragmente aus dem Stuhl von Non-A, Non-B-Hepatitis-Patienten konnten als DNA-Sonden für die Untersuchung des Stuhls, Serums, Leber-gewebe und Körperflüssigkeiten sowie Blutkonserven und Plas-maderivaten anderer Patienten mit Verdacht auf das Vorliegen einer Non-A, Non-B-Hepatitis verwendet werden. Mit den klassischen Hybridisie-rungsverfahren läßt sich so zeigen, ob in den unbekannten Stühlen DNA vorliegt, deren Sequenz der Non-A, Non-B-Hepa-titis-assoziierten DNA der erhaltenen Klone so ähnlich ist, daß sich ein Hybridisierungssignal zeigt. Mit diesem weite-rem Nachweisverfahren für Hepatitis Non-A, Non-B-assoziierten DNA-Sequenzen konnten dann Proben von Probanden unter-sucht werden auf das Vorliegen von Non-A, Non-B-Hepatitis-assozierter DNA. Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, daß es sich bei der Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierten Substanz um ein Viruspartikel handelt und daß es sich bei der isolier-ten DNA-Sequenz um eine Sequenz einer Virus-DNA handelt, wie das Aufschlußverfahren einerseits und andererseits die Se-quenz selbst zeigen.
- 25
- 30

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

35

Beispiel 1

Isolierung der Non-A-Non-B-Hepatitis assoziierten Substanz aus Patientenstuhl.

-5-

1

Verwendeter Puffer: Tris-HCl, pH 7,4; 0,05 N in allen Arbeitsschritten

- a) Aufarbeitung: 0,5 g Stuhl werden in 10 ml Puffer suspendiert, bei 8.000 g zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Der Rückstand wird noch einmal mit 10 ml und anschließend mit 5 ml Puffer gewaschen. Die gesammelten Überstände werden zentrifugiert (30 min., 10.000 rpm) und durch ein bakteriendichtes Filter filtriert (Millipore 0,22 um). Der Überstand wird mit PEG 6000 (Endkonzentration 10% bzw. 0,4 mol/l) präzipitiert. Nach mindestens 2 und höchstens 12 Stunden wird das Präzipitat abzentrifugiert und in 10 ml Puffer gelöst. Diese Lösung wird mit 10 ml Freon ausgeschüttelt, die Phasen durch Zentrifugation getrennt, die Freonphase noch einmal mit 5 ml Puffer gewaschen. Die Fällung mit PEG und NaCl (Endkonzentration 10% bzw. 0,4 mol/l) wird wiederholt, das Präzipitat in ca. 800 ul Puffer aufgenommen.

15

Die so erhaltene Lösung wird mit RNase und DNase 1 Std. bei 37°C verdaut (800 ul PEG-Präzipitat in Tris-HCl-Puffer, pH 7,4; 0,05 M; 2.900 U RNase und 1.500 U DNase, proteasenfreie Präparationen, Boehringer). Isolierungen, die nicht zur Extraktion von DNA dienen, können ohne diesen Schritt durchgeführt werden.

20

Nach Verdauung mit DNase und RNase wird das Inkubat auf einen Cäsiumchlorid-Gradienten gebracht.

25

- b) Isolierung der Non-A, Non-B assoziierten Substanz über einen Cäsiumchlorid-Gradienten.

Die Zentrifugenröhren werden mit 1 ml Cäsiumchlorid-Lösung mit einer Dichte von 1,4 g/ml gegeben und mit je 3 ml Cäsiumchlorid von einer Dichte von 1,3 g, 1,25 g und 1,2 g/ml überschichtet. Alle Cäsiumchlorid-Lösungen werden mit dem oben genannten Puffer hergestellt, der Gradient wird mit 800 ul Stuhlextrakt überschichtet, die Zentrifugationsdauer beträgt 65 - 72 Stunden. Temperatur + 10°C, rpm 31.000. Nach Beendigung der Laufzeit wird der Gradient im unteren Bereich (Dichte 1,2 - 1,4) in Fraktionen von ca. 200 ul gesammelt, im oberen Bereich Dichte 1,1 - 1,2 können größere Fraktionen entnommen werden. Die Dichte jeder Fraktion wird durch Messung des Brechnungsindex bestimmt. Alle Fraktionen werden ausgiebig gegen Puffer dialysiert und 50 ul jeder Fraktion in

-6-

1

NANB-Assay auf Non-A, Non-B assoziierende Substanz untersucht. Von den positiven Fraktionen wird die Eiweißkonzentration nach Lowry bestimmt.

5

#### Verifizierung und Charakterisierung der Substanz

##### c) Herstellung einer Gradienten-Page

10

Zwei Lösungen mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen werden durch einen Gradientenmischer zu einem linearen Gradienten aufgeschichtet. Die Lösung mit der höheren AA-Konzentration enthält außerdem 15 % Saccharose, um Turbulenzen zu verhindern. Ansonsten sind die Lösungen zusammengesetzt wie bei LAEMMLI (1970) beschrieben. Dies gilt auch für das Kammgel.

15

Die dialysierten und evtl. eingeengten Fraktionen des Cäsiumchlorid-Gradienten werden mit 10 µl SDS, 10 µl Glycerin und 5 µl beta-Mercaptoäthanol, 5 µl Bromophenolblau pro 100 µl Probe versetzt und 3 Min. im Wasserbad gekocht. Danach werden sie mit 5 µl 0,1%igem Pyronin versetzt und auf das Gel aufgetragen. Laufzeit 3 1/2 Stunden, Spannung 160 - 300 V, Stromstärke 40 - 25 A, Leistung 20 W.

20  
25

Ca. 5 Min. vor Ende des Laufes wird noch einmal 5 µl Pyronin aufgetragen und der Lauf beendet, sobald Pyronin das Kammgel durchlaufen hat. Das Gel wird entweder mit Silber gefärbt (WRAY und Mitarbeiter 1981) oder ein Western-Blotting durchgeführt (TOWBIN und Mitarbeiter 1979). Das Blotting wird über Nacht bei 0,5 A, anschließend 1 Std. bei 1 A durchgeführt.

30

##### d) Behandlung von Western-Blots

35

Nach Beendigung des Blotting werden die verschiedenen Streifen (an den Pyroninmarkierungen kenntlich) ausgeschnitten und mitgeführte Molekulargewichtsstandards mit Amido schwarz gefärbt. Probenstreifen werden 24 - 72 Stunden in 1%iger Gelatine PBS-Lösung geschüttelt. Die IgG-Fraktion eines Patienten bzw. die Fab-2-Fragmente dieser IgG-Fraktion werden mit Jod 125 (Chloramin T) markiert: 0,5 mCi auf 100 µg Protein.

-7-

- 1        Dabei werden etwa 70 % der Aktivität inkorporiert. Der Tracer, dessen  
Volumen ca. 2 ug Protein entsprechen sollte, wird in 20 ml Gelatine/PBS  
verdünnt und damit die Streifen 12 Stunden unter Schütteln inkubiert.  
Danach werden die Streifen je 1 Stunde 3 x mit Gelatine-PBS, 2 x mit  
5        PBS-Tween 0,5 % und 1 x mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen der  
Streifen werden diese auf einen empfindlichen Röntgenfilm aufgelegt und  
bei -70°C 2 - 7 Tage exponiert.
- 10      Beispiel 2  
Nachweismethode für HNANB-assoziierte Substanz im Stuhl
- 15      Polystyrol Beads (Plasticball company, Chicago) wurden mit  
Serum von rekonvaleszenten Patienten mit Non-A, Non-B-Hepa-  
titis in einer Verdünnung von 1:200 in Carbonatpuffer, pH  
9,2, 0,01 Mol/l, 12 Stunden bei Raumtemperatur  
inkubiert. Die so beschichteten beads wurden mit  
phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS)  
ausgiebig gewaschen. Die Stuhlproben wurden in Form einer  
10 %-igen Stuhlsuspension (g/V) 2 Stunden bei 37°C mit den  
wie oben geschichteten Polystyrol Beads inkubiert, danach  
ausgiebig mit PBS, die 0,5 % Tween 20 ent-  
hielt, gewaschen und danach 1 Stunde mit humanem IgG aus  
dem Serum von Rekonvaleszenten von einer Non-A, Non-B-Hepa-  
titis, das mit Jod 125 markiert war, bei 37°C inkubiert.  
Nach neuerlichem, ausführlichem Waschen mit destilliertem  
Wasser wurden die an die Beads gebundene Radioaktivität in  
20      einem Gamma-Counter ausgezählt. Stuhlproben, bei denen die  
gebundene Radioaktivität den dreifachen Wert der Negativ-  
kontrolle erreichte, wurden als positiv für das Vorliegen  
ausgewertet. Es wurde festgestellt, daß gemäß Tabelle  
25      1 bei Patienten einer gesicherten Non-A, Non-B-Hepatitis  
diese Substanz in einem großen Prozentsatz der Fälle gefun-  
den wurde,  
30      daß gemäß Tabelle 2 bei Verwendung dieses Essays für diese  
Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierte Substanz bei einem  
35      Patientenkollektiv mit einer Vielzahl von ganz unter-

-8 -

1 schiedlichen Lebererkrankungen, die aber nichts mit einer Non-A, Non-B-Hepatitis zu tun haben, die Substanz, wenn überhaupt, nur in sehr niedrigen Prozentsätzen gefunden wird.

5 Tabelle 3 zeigt, daß man während der Untersuchung von Patientenkollektiven mit Hepatitis anderer Genese, also entweder Hepatitis A oder Hepatitis B zu einem sehr niedrigen Prozentsatz die Non-A, Non-B-assoziierte Substanz findet.

10

Es ist festzustellen, daß man bei den Non-A, Non-B-Hepatitis-Fällen praktisch immer, also fast 30% positive Befunde hat, wohingegen bei den Hepatitis A, Hepatitis A-Verdacht, Hepatitis B und Posthepatitis B Patienten die Zahlen erheblich niedriger liegen.

15 Die relative hohe positive Anzahl für die Substanz bei chronischen Hepatitis B-Patienten läßt vermuten, daß es sich um eine Doppelinfektion mit Non-A, Non-B und Hepatitis B handelt.

25

Tabelle 4 zeigt folgendes: Eine Untersuchung an Empfängern mit einer Bluttransfusion, die prinzipiell als Risikopatienten zu gelten haben, weil bei Bluttransfusionen häufig eine Non-A, Non-B-Hepatitis Infektion eintritt. Es handelt sich um eine prospektive Studie.

35 Hieraus ergibt sich sehr deutlich, daß abhängig vom Schweregrad der Folgen der Transfusion einerseits Patienten gar nichts geschehen ist, wo also diese Substanzen nur in sehr geringem Maße ausgeschieden worden ist, andererseits bei Patienten, bei denen die Krankheit erkennbar ist und bei

- 9 -

1       denen, die eine ganz manifeste Hepatitis haben, in über  
70 % der Fälle diese Substanz nachweisbar ist.

5       Beispiel 3: Isolierung von DNA aus dem Stuhl und Klonierung  
von DNA-Sequenzen und deren Einbau in entsprechende Vektoren.  
Einbau dieser DNA in Klonierungsvektoren.

10      Aus dem Stuhl von Patienten mit Non-A, Non-B-Hepatitis wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierte Partikel isoliert und, wie dort beschrieben, mit RNAs und DNAs behandelt und über einen Cäsiumchlorid-Gradienten gereinigt und ausgiebig dialysiert. Die dialysierten Fraktionen wurden auf die oben beschriebene Art auf die Anwesenheit von NANB-assozierter Substanz untersucht. Die Fraktion der Dichte von 1,3 g/ml im Cäsiumchloridgradienten wurde mit 50 Mikrogramm Proteinase K, 1 % SDS und EDTA in einer Endkonzentration von 10 mM/l 6 Stunden bei 37°C verdaut. Proteine wurden durch Extraktion mit 80 %-igem Phenol (Gewicht/Volumen) und Chloroform entfernt, und daraufhin die in der wässrigen Phase gelöste DNA in Gegenwart von 0,3 Mol/l Natriumacetat mit einem zweieinhalf-fachen Volumen an Äthanol für 60 Stunden bei -70°C gefällt. Danach wurde zentrifugiert und das Sediment einmal mit 70 %-igem Äthanol gewaschen, getrocknet und daraufhin in TE-Puffer bestehend aus 10 mmol/l Tris, pH 8,0, und 1 mmol/l EDTA, in einem Volumenverhältnis von einem Mikroliter/5 mg aufgearbeitetem Stuhl, aufgenommen.

15      15 Mikroliter dieser DNA-Stammlösung wurden in einem Gesamtreaktionsvolumen von 50 Mikroliter mit 6 Einheiten Klenow-Polymerase (DNA-Polymerase I, großes Fragment), 1 Mikroliter einer Lösung von dATP, dTTP und dGTP, jeweils in einer Konzentration von 1 mM/l, sowie 5 Mikroliter alpha-<sup>32</sup>P-dCTP (3.000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) im Inkubationspuffer für Klenow-Polymerase nach den Angaben des Herstellers (Boehringer, Mannheim) 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

-10-

1 Danach wurden 2,5 Mikroliter einer 1 mMol/l dCTP-Lösung zugegeben und die Probe eine weitere Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 68°C für 10 Minuten wurde die Reaktionslösung auf  
5 0°C abgekühlt. Danach wurde das Reaktionsgemisch zusammen mit 2 Einheiten T4-DNA-Ligase, 1 Mikrogramm phosphorylierter EcoR-I-Linker und 6 Mikroliter 10 mM ATP-Lösung für 16 Stunden bei 16°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde danach auf eine Endkonzentration von 150 mMol/l NaCl eingestellt  
10 und mit 240 Einheiten EcoR-I Restriktionsendonuklease (80 Einheiten/Mikroliter) 3 Stunden bei 37°C verdaut. Die Reaktion würde durch Zugabe von 5 Mikroliter 80 %-igem Phenol und 1 Mikroliter 20 %-igem SDS gestoppt. Die radioaktiv markierte und mit Linkern versehene DNA wurde von Salz und  
15 nicht legierten Linkern über eine Sepharose 4B-CL-Säule (3 ml Säulenvolumen, 25 cm Länge) abgetrennt und mit 2,5 Volumina Äthanol 16 Stunden bei -70°C gefällt. Die präzipitierte DNA wurde 10 Min. bei 14.000 g zentrifugiert und das Sediment bei 150 Mikroliter 70 %-igem Alkohol gewaschen, getrocknet und in 10 Mikroliter TE-Puffer aufgenommen.  
20

Beispiel 4: Einbau der isolierten DNA in lambda-Phagen und Transfektion auf Bakterien.

25 Zur Ligation mit der Vektor-DNA wurden 2 Mikrogramm DNA des Phagen-lambda 1149 mit 2 Einheiten EcoR-I (4 E/Mikroliter) in einem Gesamtreaktionsvolumen von 6 Mikroliter (Inkubationspuffer nach Angabe des Enzymherstellers (Boehringer, Mannheim) 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurde das Enzym durch 10-minütiges Erhitzen auf 68°C inaktiviert. Diese Lösung wurde mit 3 Mikroliter markierter DNA, die wie im vorigen Beispiel beschrieben, isoliert wurde, 1 Mikroliter 5 mM ATP und 1 unit T4-DNA-Ligase bei Raumtemperatur ligiert.  
30 4 Mikroliter dieses Reaktionsansatzes wurden in lambda-Phagenhüllen verpackt (unter Verwendung eines fertigen Verpackungsextrakts der Firma Giga-Pack, Vector-cloning systems).  
35 Mit diesen verpackten Phagen wurde der Escherichia Coli Stamm

-11-

- 1 NM 514 infiziert. Zum screening auf das Vorhandensein einge-  
bauter DNA wurden ca.  $10^5$  "plaque forming units" auf 22 x 22  
cm screening plates der Firma Nunc ausplattiert und über  
Nacht bei 37°C inkubiert. Phagen-DNA wurde auf Nitrozellu-  
losefilter durch Abkatsch übertragen und die so erhaltenen  
5 Abkatschfilter wurden mit 1 Mikroliter der oben be-  
schriebenen radioaktiven DNA Stammlösung gemäß Maniatis et al.  
(1982) hybridisiert, gewaschen und 6 Std. bei 70°C autoradiographiert.
- 10 Von 70 positiven Hybridisierungssignalen wurden 17 zugeord-  
nete Phagenkolonien in einer Dichte von ca. 5 Plaques pro  
cm<sup>2</sup> ausplaziert. Nach plaques purification nach BENTON und  
DAVIS (1978) wurden von den schließlich erhaltenen 16  
15 positiven Plaques Lysate hergestellt. Mehrere dieser Phagen  
enthielten DNA-Inserte in einer Länge zwischen 0,3 und  
etwa 1,5 KB, die mit einer Probe der ursprünglichen DNA-  
Stammlösung hybridisierten.
- 20 Beispiel 5: Charakterisierung eines DNA-Fragmentes von 0,45 KB  
und Subklonierung dieses Fragmentes in einem Plasmid PUC 19  
in Escherichia coli.
- Das DNA-Fragment wurde durch Verdauung mit entsprechenden  
25 Restriktionsendonucleasen (EcoR-I) unter den oben bereits  
beschriebenen Bedingungen aus dem der Phagen DNA entfernt,  
das Fragment dann auf Agarose Gel von der lambda-Phagen DNA  
getrennt und die dem Insert entsprechende DNA-Bande aus dem  
Gel ausgeschnitten und eluiert. Die solchermaßen isolierte Insert-DNA wird  
30 dann genau wie oben beschrieben, in Vektor-DNA PUC 19 hineinligiert  
und dann auf Escherichia coli Stamm DH 1 transfiziert. Nach  
Selektion von Bakterienstämmen, die dieses Plasmid mit dem  
eingebauten Hepatitis Non-A, Non-B-DNA-Insert aufgenommen  
haben und vermehren wurde die Züchtung dann durchgeführt und  
35 wie bei T. Maniatis et al. 1982, in "Molecular Cloning, a

-12-

I "laboratory manual," beschrieben, aufgearbeitet.

Das gleiche Insert wurde radioaktiv markiert  
und mit Southern-Analyse auf Hybridisierung  
5 mit dem DNS-Ausgangsmaterial, DNS-Extraktionen aus Stühlen  
von Kontrollpersonen, Hepatitis B-Virus-DNS und Escherichia  
coli Plasmid PBR 322 geprüft.

Beispiel 6: Nachweis von Non-A, Non-B-assozierter DNA im Serum  
10

2 - 5 ml Serum werden bei 150.000 g 2 Stunden zentrifugiert.  
Das Sediment wird in 200  $\mu$ l Proteinase K-Lösung (0,5 mg/ml +  
10 mmol EDTA) bei 37°C 1 Stunde verdaut. Danach werden zu  
dieser Lösung 165  $\mu$ l einer heiß gesättigten Natriumjod Lösung  
15 (2,5 g Natriumjodid/ml H<sub>2</sub>O, 75°C) gegeben (Endkonzentration  
12,5 M). Diese Lösung wird 10 Minuten auf 90°C erhitzt und  
unmittelbar durch Nitrozellulosefilter mittels Vakuum  
filtriert (Dot-Blot-Apparatur, Schleicher +  
Schüll). Nach der Filtration wird die Nitrozellulosefolie  
20 3 x mit 70%igem Äthanol gewaschen und darauf 10 Min. bei  
Raumtemperatur in 100 ml Essigsäureanhydrid (100 ml 0,1 M  
Triäthanolamin + 250  $\mu$ l Essigsäureanhydrid) inkubiert. Nach  
der Inkubation wird die Folie im Vakuum bei 80°C 1 - 2 Stunden  
gebacken. Die trockene Folie wird in Vorhybridisierungslösung  
25 gebracht und 3 Stunden bei 65°C inkubiert (6 x SSC, 1 x  
Denhardt, 0,5 % SDS, 20  $\mu$ g/ml Hitze denaturierte Herings-  
sperma-DNS entsprechend den Angaben in: Maniatis, Molecular  
Cloning, 1982). Mittels Nick-Translation (siehe Maniatis,  
Molecular Cloning, 1982) mit <sup>32</sup>P-markierte Probe  
30 über Nacht unter Prähybridisierungsbedingungen inkubiert. Danach wird die Nitrozellulosefolie 3 x gewaschen (1) 6 x SSC, 1 x Denhardt, 0,5 % SDS, 20  $\mu$ g/ml Heringssperma-DNA, 2). 1 x SSC; 0,5 % SDS, 1 x Denhardt, 3). 0,1 x SSC + 0,05 % SDS). Nach Trocknen  
35 der Folie wird diese auf einen Röntgenfilm (Kodak X-Omat)  
aufgelegt (Autoradiographiezeit 6 Stunden bis 2 Tage bei  
-70°C).

-13-

- 1      Bei Seren mit hohem Gehalt an HNANB-Viren kann die Ankonzen-  
5      trierung von 2-5 ml Serum durch Zentrifugation entfallen und die Seren nach  
Klinikarzt 2/1985, Seite 86 ff) direkt auf Nitrozellulose  
aufgetragen werden. (s. Bsp. 7)

Beispiel 7: HNANB-DNA-Nachweis im Serum

- 10     200 ul Serum werden mit 75 ul Proteinase K-Lösung (Boehringer) (4 mg/ml) und  
25 ul 0,5 M EDTA bei 37°C 1 Stunde inkubiert. Das Inkubat wird mit 100 ul 1 N  
NaOH 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit 250 ul 2 M NH<sub>4</sub>OAc  
neutralisiert. 500 ul des Ansatzes (entsprechend 181 ul Serum) werden auf  
Nitrozellulose aufgetragen (Dott-Blott-Apparatur Schleicher + Schüll). Nach  
nochmaliger Neutralisierung mit 250 ul 2 M NaH<sub>4</sub>OAc werden die Filter in  
Vakuum bei 80°C 45 Minuten getrocknet. Die Filter werden in 6 x SSC\*, 0,5 %  
15     SDS\*\*, 1 x Denhardt-Lösung\*\*\* und 20 ul/ml Hitze denaturierter (5 Minuten,  
100°C) Heringsperma-DNA bei 65°C 3 Stunden prähybridisiert. Zur Hybridisierung  
die über Nacht unter Prähybridisierungsbedingungen erfolgt, wird das  
durch Nick-Translation mit <sup>32</sup>P-markierten Inserts der Phagoclone  
20     verwendet (spezifische Aktivität ca. 1 - 2 x 10<sup>9</sup> cpm/ug DNA). Die Filter  
werden danach jeweils einmal 20 Minuten bei 65°C mit 6 x SSC, 1 x Denhardt-  
Lösung, 0,5 % SDS, 20 ug/ml denaturierter Heringssperma-DNA, danach mit 1  
x SSC, 0,5 % SDS 1 x Denhardt-Lösung und 0,1 x SSC, 0,05 % SDS gewaschen  
25     und bei 80°C getrocknet. Die Autoradiographie erfolgt mittels Röntgenfilm  
und Verstärkerfolie (intensiv fying screens Kodak) mit einer Autoradiographie-  
zeit von 6 - 48 Stunden bei -70°C.

\* 20 x SSC (Standard Saline Citrat) entspricht 3 M NaCl, 1,5 M Natrium-citrat.

30     \*\* SDS Natriumdodecylsulfat

\*\*\* 100 x Denhardt-Lösung entspricht 2 % Ficoll; 2 % Polyvinylpyrolidon, 2 %  
Bovin Serumalbumin.

-14-

1      Beispiel 8

5      Dieses Beispiel zeigt eine einfachere Variante bezüglich der Probenvorbereitung zum Dot Blot:

10     1 ml Serum wird mit 350  $\mu$ l Proteinase K-Lösung (3 mg/ml Proteinase K, 10 mM TRIS pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 0,5 % SDS) und 125  $\mu$ l 0,5 M EDTA 30 Min. bei 37°C inkubiert. Darauf wird die Lösung mit 8 ml 2 M TCA (pH 7,0), 3,2 ml 2  $MNH_4A_c$ , 20  $\mu$ l t RNA (10 mg/ml) und 5,3 ml  $H_2O$  auf 16 ml verdünnt und die DNA mit 10 ml Isopropanol bei Raumtemperatur für 30 Min. gefällt. Die DNA wird abzentrifugiert (15 Min. bei 8000rpm), das Pellet mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen und in 600  $\mu$ l 10 mM TRIS pH 8,4 und 1 mM EDTA aufgenommen, einmal mit Phenol, einmal mit Chloroform extrahiert und nochmals gefällt. Aliquots der gefüllten DNA können für die Dot Blots oder für Restriktionsanalysen eingesetzt werden.

20     Die Darstellung von partikelassozierter DNA aus Stuhlproben erfolgt in gleicher Weise. Stuhlsuspensionen werden allerdings vorher steril filtriert und mit PEG gefällt.

Beispiel 9

25     Wenn nur relativ wenig der N-A, N-B-assoziierten Substanz vorliegt, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, die DNA durch Amplifizieren nachzuweisen:

30     Der Nachweis von Non-A, Non-B-DNA im Serum kann zweckmäßig durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter klonierter Non-A, Non-B-DNA-Probe nach vorangehender spezifischer enzymatischer DNA-Amplifizierung nach bekannter Methode (SAIKI et al., Science 230, 1350, 1985) erfolgen.

-15-

1    25,ul Serum + 50,ul NaJ (gesättigte Lösung) mischen und  
2 Min. bei 37°C inkubieren, danach 10 Minuten bei 0°C  
inkubieren. Das Inkubat wird auf eine Polycarbonatmembran  
z.B. Uni Pore von Firma BioRadLab) gegen TE-Puffer (10 mmol  
5    Tris; 1mmol EDTA) 20 Min. dialysiert. 5,ul des Dialysats  
werden für die spezifische enzymatische DNA-Amplifikation  
entnommen. Die Amplifikation erfolgt nach bekannter Methode  
(SAIKI et al. 1985) mit Hilfe von je 0,5 ,ug Oligoprimer  
(Paar A und B bzw. C und D). Die Oligoprimer-Paare werden  
10    nach bekannten Sequenzierungsdaten mittels eines  
DNA-Synthesizers (Applied BioSystem 381) hergestellt. Nach  
Amplifizierung wird das Reaktionsgemisch auf einem 2%igen  
Agarosgel elektrophoretisch aufgetrennt, danach auf eine  
Nylonmembran (Genofit) transferiert und mit einer nach  
15    FEINBERG et al. 1983 (Annal. Biochem. 132, 6-13) mit <sup>32</sup>p  
markierten klonierten HNANB-DNA-Probe hybridisiert. Nach  
Autoradiographie werden positive Resultate anhand  
mitgeführter Standards und Längenmarker identifiziert.

20    Beispiel 10

Nachweis von DNA in geprüft infektiösem Plasmaderivat:  
Renger F. et al. veröffentlichten in "Deutsches  
Gesundheitswesen" Vol. 36, S. 560-563 (1981) eine Studie  
25    über eine kontrollierte Hepatitis Non-A, Non-B-Epidemie,  
ausgelöst durch die Applikation infektiöser Antirhesusfaktor  
D Immunglobulinpräparate. Die Herkunft dieser kontaminierten  
Präparate konnte vollkommen aufgeklärt werden. Nach  
Applikation dieses anti-D-Präparates erkrankten 79 % von 116  
30    immunisierten schwangeren Frauen. Dieses anti-D-Präparat

-16-

I (Charge I Ampulle A und C) sowie eine Charge mit niedriger Infektiosität (Charge II Ampulle B und D), die durch das selbe Säulensystem gereinigt wurde, standen zusammen mit Kontrollpräparationen (Gammavenin, Endobolin, Rhesonativ) zur Verfügung. Diese Präparationen wurden zusammen mit Pufferkontrollen, Hepatitis B-Virus-haltigem Serum, Positivkontrollen mit clonierten Virus-DNA-Fragmenten eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mittels DNA-Amplifikation durch die Primer 237-238 (entstammen dem 0,4 Kb EcoRI-Fragment).

Ergebnisse:

In mehrfachen, unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Experimenten, fand sich nach Amplifikation ein starkes Signal in der Charge I (Ampulle A und C), ein schwaches Signal bei guter Amplifikationsausbeute in der Charge II (Ampulle B und D). Die drei Kontroll-Lyophilisate Gammavenin, Endobolin und Rhesonativ ergaben kein Signal. Der Zusatz von Hepatitis B-Virus-Genomspezifischen Primern zu den verschiedenen Gammaglobulin-Präparationen ergab ebenfalls keinen Hinweis auf die evtl. Kontaminierung mit Hepatitis B-Genom. Die mitgeführten Kontrollen dienten der Beurteilung der Effizienz der Amplifikation sowohl mit HBV-spezifischen Primern als auch mit Non-A, Non-B-spezifischen Primern. Der Nachweis der Identität der in der infektiösen Charge befindlichen DNA mit der DNA aus den Feces eines Patienten mit Hepatitis Non-A, Non-B sprechen für die Identifizierung einer in Hepatitis Non-A, Non-B-implizierten DNA.

Die Untersuchung von weiteren 57 Stuhlproben von Patienten mit sporadischer und posttransfusioneller HNANB mittels Radioimmunoassay wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben und im Dot-Blot-Verfahren, ergab eine signifikante Korrelation der beiden Untersuchungsverfahren hinsichtlich nachweisbarer HNANB-assoziierten Substanz (RIA) und nachweisbarer DNA (Dot-Blot, siehe Beispiel 7).

-17-

- 1 Die beigefügten Abbildungen erläutern die Erfindung:  
Fig. 1 ist die Sequenz des Genoms
- 5 Fig. 2 ist eine Übersicht über die Schnittstellen mit EcoRI sowie die offenen Leserahmen und Leseraster
- 10 Fig. 3 und  
Fig. 4 zeigen den Plus- und Minusstrang einer ca. 0,3 kb Sequenz, also einer Teilsequenz des Genoms  
Fig. 5 zeigt den offenen Leserahmen, und zwar die Leseraster 1A, 2A und 3A, und
- 15 Fig. 6 zeigt den offenen Leserahmen für die Leseraster 1B, 2B und 3B.

Die Sequenzierung der in den Figuren beigefügten Sequenzen erfolgte nach der Sanger-Methode nach Umlklonieren von PUC 8 15 in M 13 bzw. Bluescript Vektor.

Die Charakterisierung dieser in Fig. 1 gezeigten ursprünglich vorliegenden aus Stuhlisolaten isolierten DNA zeigt, daß es sich um eine partiell doppelsträngige 20 zirkuläre DNA handelt.

Die DNA zeigt Verwandtschaft mit HBV-DNA. Wenn ein kloniertes 0,45 kb Fragment oder gereinigtes Stuhlmaterial mit <sup>32</sup>P markiert und in einer Southern-Analyse an HBV-DNA 25 hybridisiert wurde, ergaben beide Proben ein Signal, allerdings etwa 1000-fach geringer als mit sich selbst. Plasmid pBR 322 und Lambda Phage ergaben kein Signal. In Vorversuchen konnte die gereingite Stuhlprobe, ohne 30 denaturiert zu werden, sehr gut mit dem kleinen Fragment der E.coli Polymerase markiert werden.

Mit Klenow Polymerase behandelte Stuhlprobe migrierte in einem Agarosegel deutlich langsamer als die unbehandelte Probe. Dies spricht dafür, daß die untersuchte DNA, ebenso 35 wie HBV-DNA, partiell doppelsträngig ist. Die Ergebnisse und Behandlung mit Restriktionsenzymen und Primerextension beweisen eine circuläre Struktur der DNA.

-18-

- 1    Die mehrfach durchgeföhrten Sequenzanalysen beider DNA  
Strände ergaben 4998 Basenpaare. Die Sequenz ist vom 5'- zum  
3'-Ende dargestellt, die Nummerierung mit 1 beginnt im  
ersten Nucleotid des 2,5 Kb EcoRI-Fragments in dem  
5    DNA-Strang, der die großen offenen Leserahmen enthält (siehe  
Abb. 2). Ein in der Darstellung nicht gezeigtes DNA-Fragment  
von ca. 10 bis 20 Basenpaaren wurde experimentell  
nachgewiesen und grenzt an die 2,5 und 1,5 Kb  
EcoRI-Fragmente und bedingt also den Ringschluß der linear  
10   abgebildeten DNA (vgl. Abb.2). Der Nachweis dieses Fragments  
wurde durch ein Amplifikationsexperiment erbracht, wobei  
gereinigte Virus-DNA mit Klenow Polymerase und den beiden  
synthetischen Primern 13 und 17 inkubiert und die  
DNA-Sequenz zwischen den Primern mehrfach amplifiziert und  
15   nach Elektrophorese durch Southern-Analyse nachgewiesen  
wurde. Da die beiden Primer an den beiden Enden der  
sequenzierten DNA liegen, kann eine Amplifizierung eines  
Fragmentes nur erfolgen, falls die DNA zirculär vorliegt.  
Das Virus-Genom besitzt damit eine Gesamtlänge von 5.010 bis  
20   maximal 5.050 Basenpaare. Dieses Resultat wird zusätzlich  
durch unabhängige Southern-Analyse des Genoms bestätigt. Die  
Restriktionskarte des Genoms liegt vor. Die Reihenfolge z.B.  
der einzelnen EcoRI-Fragmente ist: 1,5 / 0,45 / 0,3 / 0,15  
und 2,5 Kb.  
25  
Bezüglich besonderer Merkmale der Sequenz ist auszuföhren,  
daß eine lange palindromische Sequenz (Hairpin) zwischen den  
Basenpaaren 2.097 und 2.149 am Ende eines offenen  
Leserahmens liegt (Pos. 4, Abb. 2).  
30  
An der Position 424 und 3.303 befindet sich je eine  
"CTG"-Box. Bei der CTG-Box von 3.303 befinden sich auch 2  
Repeats, die Sequenzhomologie mit den direkten Repeats der  
Hepadnaviridae aufweisen.  
35

-19-

1 Die offenen Leserahmen finden sich hauptsächlich nur auf  
einem Strang. Der andere Strang ist wie bei Hepatitis  
B-Virus-DNA bis auf kleinere Peptide geschlossen. Während  
der offene DNA-Strang ohne weitere Modifizierung für  
5 Proteine bis zu Molekulargewichten über 40.000 codieren  
kann, sind im Komplementärstrang weite Bereiche aller drei  
Leseraster geschlossen bis auf 5 Peptide von einem kleineren  
Molekulargewicht von ca. 6.000 (siehe Abb. 2 und Abb. 5 und  
6).

10

Alle überlappenden Clone ergaben für die gleiche Sequenz  
identische Resultate mit einer Ausnahme, wo an der Pos.  
2.381 in einem Fall G, in einem anderen Fall A gefunden  
wurde. Ein Sequenzierfehler ist auszuschließen.

15

Das gibt einen Hinweis darauf, was durch weitere Befunde  
bestätigt wird, daß Abweichungen von einigen Prozent,  
insbesondere 1 bis 2 %, in der Regel keinen Einfluß auf die  
Funktion der Sequenz haben, so daß funktionelle Äquivalente  
20 Abweichungen bis 5 %, insbesondere bis 2 % von der  
Grundstruktur haben können. Das gleiche gilt auch für die  
von solchen DNAs kodierten Proteinen.

25

Zusammenfassend lässt sich somit folgendes sagen:  
Die Non-A, Non-B-assoziierte Substanz ist gekennzeichnet  
durch die signifikante Bindung an Immunglobuline und die  
Bindung an Fab2-Bruchstücke gereinigten IgGs, durch Bindung  
an nicht kollagenbindende Fibronectinspaltprodukte sowie  
durch die Infektiösität gegenüber menschlichen  
30 Zellkulturlinien, die morphologisch darstellbar sind durch  
virustypische Veränderungen derselben und molekulargenetisch  
durch den Nachweis einer spezifisch hybridisierenden,  
gelektrophoretisch bei einer scheinbaren Größe von 3,2 KB  
wandernden DNA (ungeschnitten und unter nativen  
35 Bedingungen), innerhalb dieser Zellkulturen.

-20-

- 1 Die in den infizierten Zellen sowie im Serum von Non-A,  
Non-B-Hepatitis-Patienten nachweisbare DNA hybridisiert mit  
der aus Non-A, Non-B-Substanz isolierten, ca. 5 KB großen  
DNA bzw. der aus diesem Material hergestellten klonierten  
5 DNA.

Die gesamte Sequenz von ca. 5.000 Basenpaaren gemäß Fig. 1  
und eine Teilsequenz von ca. 300 Basenpaaren gemäß Fig. 3  
und 4 der klonierten DNA wurden bestimmt und mit bekannten  
10 menschlichen DNA-Sequenzen, Phagen-DNA-Sequenzen,  
Plasmid-DNA-Sequenzen und bekannten publizierten  
Virus-DNA-Sequenzen verglichen. Sie entsprechen nach diesen  
Daten keiner bisher beschriebenen Sequenz. Nach dem offenen  
Leserahmen der Sequenz kann man Rückschlüsse auf die  
15 kodierten und exprimierten virusspezifischen Proteine  
ziehen. Damit kann man die hydrophilen und hydrophoben  
Regionen innerhalb der Peptide identifizieren und somit ist  
die Herstellung synthetischer Peptide aus den möglichen  
antigenen Epitopen in den hydrophilen Regionen möglich.  
20

Die gefundene DNA, insbesondere die auf dieser DNA sich  
befindlichen Gene können zur Insertion in entsprechende  
Expressionsvektoren, wie Zellen und Bakterien (z.B. E.coli  
und Hefen, wie *Saccharomyces cereviciae* sowie Zellkulturen),  
25 und damit zur Herstellung von Virusantigenen benutzt werden.  
Damit ist die Diagnostik und die Herstellung von  
Immunreagentien und Vaccinen möglich. Bei der Diagnostik  
sind insbesondere die Untersuchung auf Infektiosität  
(Blutkonservenuntersuchung) und die Diagnose einer akuten,  
30 chronischen oder zeitlich zurückliegenden Infektion zu  
nennen. In Zellkulturen hergestellte Antigene sowie die  
entsprechenden, durch diese Virus-DNA in vivo und in vitro  
synthetisierten Proteine können zur Erstellung  
immunologischer Diagnostika benutzt werden. Die DNA-Sequenz  
35

-21-

- 1 lässt sich zur Identifizierung potentieller Virusproteine und  
deren synthetischer Herstellung, also die Herstellung  
synthetischer antigener Peptide, verwenden, ebenso wie sich  
die DNA bzw. DNA-Teilsequenzen zur Herstellung synthetischer  
5 DNA oder RNA bzw. DNA- oder RNA-Fragmente und für den  
Einsatz derselben als Sonden oder Primer für die Diagnostik  
einsetzen lassen. Schließlich kann man die DNA bzw. die  
erstellte DNA-Sequenz zur Herstellung synthetischer Viren  
(vollkommene DNA-Synthese) und zur Insertion von  
10 synthetischer DNA oder DNA-Fragmente in entsprechende  
Vektoren verwenden, um Virusexpressionsprodukte zu erhalten.

15

20

25

30

35

22

Patentansprüche

1. NANB-Hepatitis assoziierte DNA, enthaltend vor allem die DNA nach Figur 1 sowie funktionelle Äquivalente und Teilsequenzen davon.
2. NANB-Hepatitis assoziierte DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie höchstens 5 %, insbesondere höchstens 2 % Abweichung von der Struktur und/oder der Kettenlänge der DNA nach Fig. 1 zeigt.

23

- 1       3. NANB-Hepatitis assoziierte DNA nach Anspruch 1 oder  
          2, dadurch gekennzeichnet, daß sie partiell doppel-  
          strängig zirkulär und aus einem NANB-Hepatitis  
          assoziierten Partikel bzw. aus Virus isoliert ist.
- 5       4. DNA-Teilsequenz nach Anspruch 1 -3, dadurch  
          gekennzeichnet, daß sie Fig. 3 bzw. 4 mit maximal  
          5 %, vorzugsweise maximal 2 %, Abweichung entspricht.
- 10      5. Proteine, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch eine  
          DNA nach Anspruch 1 bis 4 kodiert sind oder derart  
          kodierten Proteinen entsprechen.
- 15      6. Proteine nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß  
          sie den Sequenzen der offenen Leserahmen gemäß  
          Fig. 5 und 6 entsprechen.
- 20      7. Verfahren zur Herstellung der NANB-assoziierten DNAs  
          nach Anspruch 1 -4 (sowie der Proteine nach Anspruch  
          5 und 6) aus Stuhl, Gewebe, Körperflüssigkeiten  
          oder Viruskulturen, dadurch gekennzeichnet, daß  
          das Ausgangsmaterial, ggfs. nach vorheriger  
          Sterilfiltration und Fällung mit PEG bei Stuhl-  
          suspensionen, mit DNase und ggfs. RNase zur Verdauung  
          inkubiert wird, dann ein Dichtegradient, insbesondere  
          CsCl,  $d = 1,3$ , angelegt wird, worauf Dialyse,  
          Verdauung mit Proteinase K, Phenolextraktion, Äthanolfällung  
          und ggfs. Extraktion und erneute Fällung  
          und Isolierung sowie ggfs. Klonen und ggfs.  
          exprimieren in entsprechenden Vektoren erfolgen.
- 25      8. Verwendung der DNAs nach Anspruch 1 bis 4 als  
          DNA-Sonden zur Diagnose, insbesondere nach klassischen  
          Hybridisierungsverfahren, oder zur Expression in  
          geeigneten Vektoren.
- 30
- 35

24.

1

9. Verwendung der DNAs nach Anspruch 1 bis 4 zur Synthese von Proteinen zur Erzeugung immunologischer Reagentien für den Nachweis von NANB-Hepatitis und zur Erzeugung von Impfstoffen.

5

10. Verwendung der DNAs nach Anspruch 1 bis 4 oder der auf diesen DNAs befindlichen Gene bzw. der entsprechenden DNA-Sequenzen zur Herstellung synthetischer Viren und zur Insertion der natürlichen oder synthetischen DNAs oder DNA-Fragmente in entsprechende Vektoren zur Bildung von Virusexpressionsprodukten und zur Herstellung von Virusantigenen.

15

20

25

30

35

i|13

1 FILE: TONGA.DNA SEQUENCE: 4998BP; 996 A; 1130C; 1087 G; 1

\*\*\* SEQUENCE LIST \*\*\* (DOUBLE)

	10	20	30	40	50	60
5	5' GAATTCTGCC	TCTTCIGTGT	ATTCTGATGT	TGCCCTCCGGT	GCTTCIGGTC	TTCCTGGCGG
	3' CTTAAAGACGG	AGAAGACAAC	TAAGACTACA	ACGGAGGCCA	CGAAGACCAG	AAGAACCGCC
	70	80	90	100	110	120
	TCTTTTCCAG	AATTTAGCCA	CGTTTCIMIT	CTCTGTTTCT	CTCCCTTGCT	TGGGCCCTGT
	AGAAAAGGTG	TAAATCCGT	CTAAAGAAAA	GAGACAAAGA	GAGGAAACGA	AACCGCGACA
	130	140	150	160	170	180
	TGTTCTCGA	ATGCCTTATA	GAAAGCGGT	TGAOGGATGA	CCTTCTTGA	TTTCTTCAA
10	ACAAGAAGCT	TACGAATAAT	CTTTCCGCCA	ACTGCCCTACT	GAAAAGAACT	AAAGAAGTT
	190	200	210	220	230	240
	TCAGTTTTA	ACCTTTTCGG	TTCIGGTGGC	GCTCTCGICA	TTCGCGTTGT	TGTTTTCTT
	AGTCAAAAAT	TGGAAAAGCC	AAGACCACCG	CGAGAGCAGT	AACGGCAACA	ACAAAAAGAA
	250	260	270	280	290	300
	GTGGCCCTCG	GTATTATATA	GTTCGTAAG	GATGGTGTG	CATGGTAGAC	TTTGTTCGG
	CAGCCGGAGC	CATAAATATT	CAAGCATTT	CTAACCAACG	GTACCATCTG	AAACAAAGGC
15	310	320	330	340	350	360
	CTCTTGGCGT	TTTACCTCG	TTTATGCCA	ATGTCCTTC	TATTTCCITT	TTTGGCTT
	GAGAACCGCA	AAAATGGAGC	AAAATAGCGGT	TACACGAAAG	ATAAAGGAAA	AAACCGAAC
	370	380	390	400	410	420
	GTACTTTGG	CAACTTTATT	TTGGTTGTC	TTTGCTTTC	GCCTGTTGGC	TTTGTTCCT
	CATGAAAACC	GTGAAATAA	AACCAAACAG	AAAACGAAAG	CGAACAAACG	AAACAAAGAGA
	430	440	450	460	470	480
	GTGGCCTTG	GGATGGAGGT	GATAAATAGT	CGAAATCCCT	ATTATTATCA	ATACTGGGT
20	CACCGAAAC	CCTACCTCCA	CTATTTATCA	CCMTAGGG	TAATAATAGT	TATGAACCCA
	490	500	510	520	530	540
	TGATGCTGAC	GGCGTTACCG	TCTATACAGT	GCAGTATAAA	GATGGTAGCA	CTTGGCGATAT
	ACTACGACTG	CGCGCAATGGC	AGATATGTC	CGTCATATTT	CTACCATCTG	GAACGCTATA
	550	560	570	580	590	600
	GACCGTCCAG	CAGTATGATT	ATCTCAAGGC	ATCCCGCGAG	GCTGTGGCCG	ATATGGACTC
	CTGGCAGGTC	GTCATACTAA	TAGAGTTCCG	TAGGCGCGTC	CGACAGCGGC	TATACCTGAG
25	610	620	630	640	650	660
	TAAAGCCGCT	GCTGATTCTC	CTTCGGAAGC	TGCTCTGCT	CCCGAGGAAC	CTGCACAGAA
	ATTTCGCGA	CGACTAAAGAG	GAAGCCTCG	ACGAGGACGA	GGGCTCCTTG	GAAGGTTCTT
	670	680	690	700	710	720
	TATTATTGAA	TCTCCTGACC	TCCCGGAAGG	TTATGTGGCG	CAGGAAGAAG	AATTACCTTT
	ATAATAACTT	AGAGGACTGG	AGGGCCTTC	AATACACGGC	GTCCCTCTTC	TTAATGGAAA
	730	740	750	760	770	780
	TGAGGGAGT	TTAACCGCTT	ATGATGACCG	CGCAGCAGAT	ACTCCGGCTT	TGTATGCTAA
30	ACTCCCCCTCA	AATGGCGAA	TACTACTGGC	CGCTCGTCTA	TGAGGCCGAA	ACATACGATT
	790	800	810	820	830	840
	TCTCCCTAAC	GTCCTCTAATA	GTTCACIAC	TATTATGGAT	TGGTTGGAG	ATACGTTTT
	AGAGGGATTG	CAGAGATTAT	CAAAGTGATG	ATAATACCTA	ACCAAGCCIC	TATGCAAAAA
	850	860	870	880	890	900
	TATCGAACGT	ACTGAGACGG	TGGCAAACTG	CGGCTATACG	TCTGAAAGGT	ATTCCCTATAA
	ATAGCTTGC	TGACTCTGCC	ACGTGTTCA	GGCGATATGC	AGACTTTCCA	TAAGGATATT
35	910	920	930	940	950	960
	CAGCTCGACT	CAACTTATTTC	AGCTTCCITA	TGCGGAGGAT	TCCACTACTA	CGTCTCAGGT
	CAGCTCGACT	CAACTTATTTC	AGCTTCCITA	TGCGGAGGAT	ACCCCTCCCA	AGGTGATGAT
						GCAGAGTCCA

2/13

1	970	980	990	1000	1010	1020
	TCTCAATCGG	CAAGCTGGC	TTTCTGCCTT	GCTTGTTGTC	CITGTCITCG	TTACTACTGT
	AGAGTTAGGC	GTTCGAACGC	AAAGACGAAA	CGAACACAG	GAACAGAAGC	AATGATGACA
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	TACTTGGATT	AAAAACGCGA	TTTGGGGGCG	CATGAGTTAA	TGGAAATTCT	ACCTTTACAG
5	ATGAACCTAA	TTTTTGGCT	AAACCCCCGC	GTACTCAATT	ACCTTTAAGA	TGGAAATGTC
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	TATTGTTTCG	GTATCTTCIC	TGICCCCCGAA	ATTGGCTATT	TCATTGTCIT	CGCTGCTGTT
	ATAACAAAGC	CATAGAACAG	ACAGGGGCTT	TAACCGATAA	AGTAACAGAA	CCGACGACAA
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	TTCTCITTGT	TGGTCTCTCT	GCTCOGTCG	TGACAGGTGC	CATAAAATTATT	ATTATGAAAG
	AAGAGAAACA	ACCAGGAGGA	CGAGGCAGGC	ACTGTCCACG	GTATTITATAA	TAATACITTC
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
10	GATGATGACT	TCAGGGGCGT	ACTTCITCTA	TTCTCGCTAC	GCTGCTTTC	TIGGTCGGTG
	CTACTACTGA	AGTCCCCGCGA	TGAAGAAGAT	AAGAGCGATG	CGACGAAAGG	AACCAGGCCAC
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	AGTTCITTCAC	CTCGATGATT	ACTTGGATGG	GTCAGCTCAT	TGATTTCAT	GAGTCCTACG
	TCAAGAAATG	GAGCTACTAA	TGAACCTACC	CAGTCGAGTA	ACTAAAGATA	CTCAGAGTCG
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
	CCATTCTCTT	TGTCTTGTG	ATTCTCACTA	TCGCGGGCAT	TGTTCTCCGT	ATCCCTTGC
	GGTAAGAGGA	ACAGAACAC	TAAGAGTGAT	AGCGCCCGTA	ACAAGAGGCA	TAGGPAGCGG
15	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	GCIIGGATTCC	TGGTCTGCC	TAACGACTGA	GAGAAAACGC	CGCGGACCAT	TTAATGGTC
	CGACCTAAGG	ACCAGCGPGG	ATTGCTGACT	CTCTTTTGC	GCGGCTGGTA	AAATTACCG
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	GGCGACGTTT	TCITTAITTTAG	AAAGGATTAT	TGTTTATGCT	TTATGGTATT	CITATCTTT
	CCGTGCAA	AGAATAAAATC	TTTCTTAATA	AACAATACGA	AATACCATAA	GAATAGAAAA
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
20	GCGTTTGCTG	GCCTTTGTT	TATATCGATA	ACTATTGCAA	AAATCCCTAC	AAGCTCGAAG
	CGCAAACGAC	CGAAAAACAA	ATATAGCTAT	TGATAACGTT	TTTACGGATG	TTCGAGCTTC
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
	CTGTTGTTGG	TTCTAAAGGT	TCTGGCAAGT	CICIGTATAT	GTCTCGCGTT	GCTGATAAGT
	GACAACAACC	AAGATTCCA	AGACCGTICA	GAGACATATA	CAGAGCGCAA	CGACTATTCA
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
	GGCTTCGTC	TAGTAAGGGG	TTTATTATA	GCAATATGGG	TATTGGTTAT	GATTAGAGC
	CCGAAGCGAG	ATCAATTCCCC	AAATAATAT	CGTTATACCC	ATAACCAATA	CTAAATCTCG
25	1690	1700	1710	1720	1730	1740
	CGGAATATTG	GAAACAGACCC	TTTGCCTCTG	ATTCCCCATT	TCTTATGAT	GAGATAGGCG
	GCCCTTATAAC	CTTTCGTC	AAACGGGGAC	TAAGGGATA	AGAATAACTA	CTCTATCCGC
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
	TGCTCCACTC	TAACCGTGAT	TTTAAGGCTA	TGCCCCGTGA	AGCTGTCGAG	TTTTCAAGA
	ACGAGGTGAG	ATTGGCACTA	AAATTCGGAT	ACGGGGCACT	TGGACAGCTC	AAAAGTTCT
	1810	1820	1830	1840	1850	1860
30	TGCAGCGCAA	ATATCACTTG	ACAATAGTTG	TATCGTCCTCA	GACCATGGAC	TTTGATAAAA
	ACGTCGCGTT	TATAGTGAAC	TGTTATCAC	ATAGCAGAGT	TGGTACCTG	AAACTATTT
	1870	1880	1890	1900	1910	1920
	AGATTCTGTA	CCTCTGTGAT	CGCATTATTC	TCTCCATCG	TATTGGCTGG	TTTGTGCGCC
	TCTAAGCT	GGAGACACTA	GCGTAAATAG	AGACGTTAGC	ATAACCGACC	AAAACAGCGG
	1930	1940	1950	1960	1970	1980
	TCACCCCTTA	TCCCTCCTGT	ATCGCTATGG	AAACACCGTCC	CGAGGGCGGC	CAAGAGCTTG
	AGTGGGGAT	AGCGAGGACA	TAGCGATACC	TTCTGGCAGG	GCTCCCGCCG	GTTCTCGAAC
35	1990	2000	2010	2020	2030	2040
	TTAACACGGT	GGCCACGGCG	GGCAGGGCTA	AGTCGTATAC	TATCCCCAG	TCTGTGAAAGC
	AATTGCGCA	CCGGTTCCCC	CCGTCCCGAT	TGACCTATAG	ATAGGGGTTG	AGACACTTCG

313

1	2050	2060	2070	2080	2090	2100
	AGGTGAGTGC	CITAGAATAT	GATACAGAGC	AGGTATTCAG	CAAGACCCCC	TGAAAGTAAA
	TCCACTCACG	GAATCTTATA	CTATGTCCTG	TCCAATAGTC	GTCTGGGGG	AGCTTCATT
	2110	2120	2130	2140	2150	2160
	AAAAAAAAAAC	TCCCCGTGCC	CCCGTAGGGG	GTTAGGGGAG	TTTTTTTTT	TTTTTTTTT
5	TTTTTTTTG	AGGGGCAACGG	GGGCATCCCC	CAATCCCCC	AAAAAAA	AAAAAAA
	2170	2180	2190	2200	2210	2220
	TACTGGAGCA	CTCCCGCGGT	CITGTCACGC	GATAGCGTCT	CCACCCGTC	CCCCGTCCCC
	ATGACCTCGT	GAGGGCGGCC	GAACAGTGCG	CTATCGCAGA	GGTGGCGCAG	GGGGCAGGGG
	2230	2240	2250	2260	2270	2280
	GCGAGGGCAA	AGCCCTGCC	CITCCCAAAC	AGACCGGTAG	GGGCTCCGA	TACGTACTGA
	CGCTCCCGTT	TOGGGAGOGG	GAAGGGTTTG	TCIAGGCCATC	CCCGAAGGCT	ATGCATGACT
	2290	2300	2310	2320	2330	2340
10	CTGCGGTGAC	GATGGGAACG	TGGGGTGCG	TGTAAATACGC	CCACGAAATT	TAATTTCTC
	GACGGCACTG	CTACCCCTGC	ACCCGCACGC	ACATTATGCG	GGTGCCTTAA	ATTTAAAGGA
	2350	2360	2370	2380	2390	2400
	CITGACAAC	CAATTCAACT	GTGGTAAATAT	TTAGCCATGG	AAATGAAAGG	TGGTTTCTC
	GAACIGTTGA	GTAAGTATGA	CAOCAATTATA	AATCGGTACC	TTTACCTTCC	ACCAAAAGAG
	2410	2420	2430	2440	2450	2460
	GTATGAAAC	GGTTGTTAAA	CITGATTAATG	CTACGTTCCG	CITTGAGCAA	GGTCAATT
	CATACTTTG	CCAACAATTIT	GAACAAATAC	GATGCAAGGG	GAAACTCGTT	CCAAGTTAAA
15	2470	2480	2490	2500	2510	2520
	CTATTCCAA	AATCGAAGAT	CCGGCTTGC	AGTGTGATT	ACATTTCGCA	CAGATATCTA
	GATAAGGGTT	TTAGCTTC	CGCGAACGAG	TCACACTAA	TGAAAACGT	GTCTATAGAT
	2530	2540	2550	2560	2570	2580
	ACGCAAGTGA	GAATTCCCCC	TACAATTCCC	CITGOGGGACT	CITCCTTAAG	CTTAACAAACG
	TGGCTTCACT	CTTAAGGGGG	ATGTTAAGGG	GAOGCCCTGA	GAAGAAATT	GGATTGTTGC
	2590	2600	2610	2620	2630	2640
20	GGCGGAAACA	GTCTCGCAC	TCTTACAAG	TGTCCTGGICA	TGGTTGTGAG	CITTTCCGCT
	CGCGCTTGT	CAGAGGCGTG	AGAAAATGTT	ACAGACCAGT	ACCAACACTC	AAAAAGGCAG
	2650	2660	2670	2680	2690	2700
	CTACCTTGCC	TCGGCTCGG	TCCTTGATGC	AGGAAGGTCA	CGAATTCCGT	CACTTTCTC
	GATGGRACGG	AGCCGAGCGC	AGGAACATACG	TCCCTCCAGT	GCTTAAGCCA	GTGAAAAGAG
	2710	2720	2730	2740	2750	2760
	GTCCTTGACIT	TTGCTTTGAT	GTGTTATGA	CAAAACTACG	GIGGOGTGAG	TTTATTTGG
25		CAGAACTGAA	AACGAAACTA	CAACAAACT	GTGTTGATGC	CACCGCACTC
	2770	2780	2790	2800	2810	2820
	GIGTGTCTC	TGCTTCCGIC	GATGAGATGA	ATAATCCCGA	AAAAGCCGT	AAGGTCGCA
	CACAATAGAG	ACGAAGGCG	CTACTCTACT	TATAGGGCT	TTTCGGGCA	TTCCAAGCGT
	2830	2840	2850	2860	2870	2880
	AATTCAATGTA	TCAGGGCTAT	GGTGATCCA	CTACCGTTA	TATCGGTGCG	AGAAAGTCCT
	TTAAGTACAT	AGTCCCCATA	CCACTAAGGT	GATGGCAAAT	ATAGCCAGCG	TCTTTCAGAA
	2890	2900	2910	2920	2930	2940
30	CTGCTGCTT	CTGGCGTATT	TATAATTAATG	CTCTGCAAGA	CCCTGAAAAA	AAGCTCTGTG
	GACGACGAA	GACGGCATAA	ATATTATCA	GAGACGTCT	GGGACTTTT	TTGGAGACAC
	2950	2960	2970	2980	2990	3000
	CGGCTCTGG	TGAGCTCTG	GACTGCCCTG	ATGATTCTTA	TATTATTCGT	TATGAGATGG
	GCCGAAAGACC	ACTCGAAGAC	CTGACGGGAC	TACTAAGAAT	ATAATAAGCA	ATACTCTACC
	3010	3020	3030	3040	3050	3060
	AGTTAAATT	TACTCTCGT	GTGAATTCTT	TTGGCCGTAC	CGTTTATGAC	CCCTCTCCCC
	TCATTTAA	ATGAGAGAGCA	CACTTAAAGAA	AACCCGGCTG	GCAAATACTG	GGGAGAGGGG
35	3070	3080	3090	3100	3110	3120
	TCITTTGGCA	GTATTACGAA	GRCCCTGTA	AGCTCTCCG	CTNTCTCCGT	AAAGCTCTGG
	AGAAAACCGT	CATAATCCCT	CTCGGACTAT	TCGAGAGGG	GATAGAGGG	TTTCAGACCT

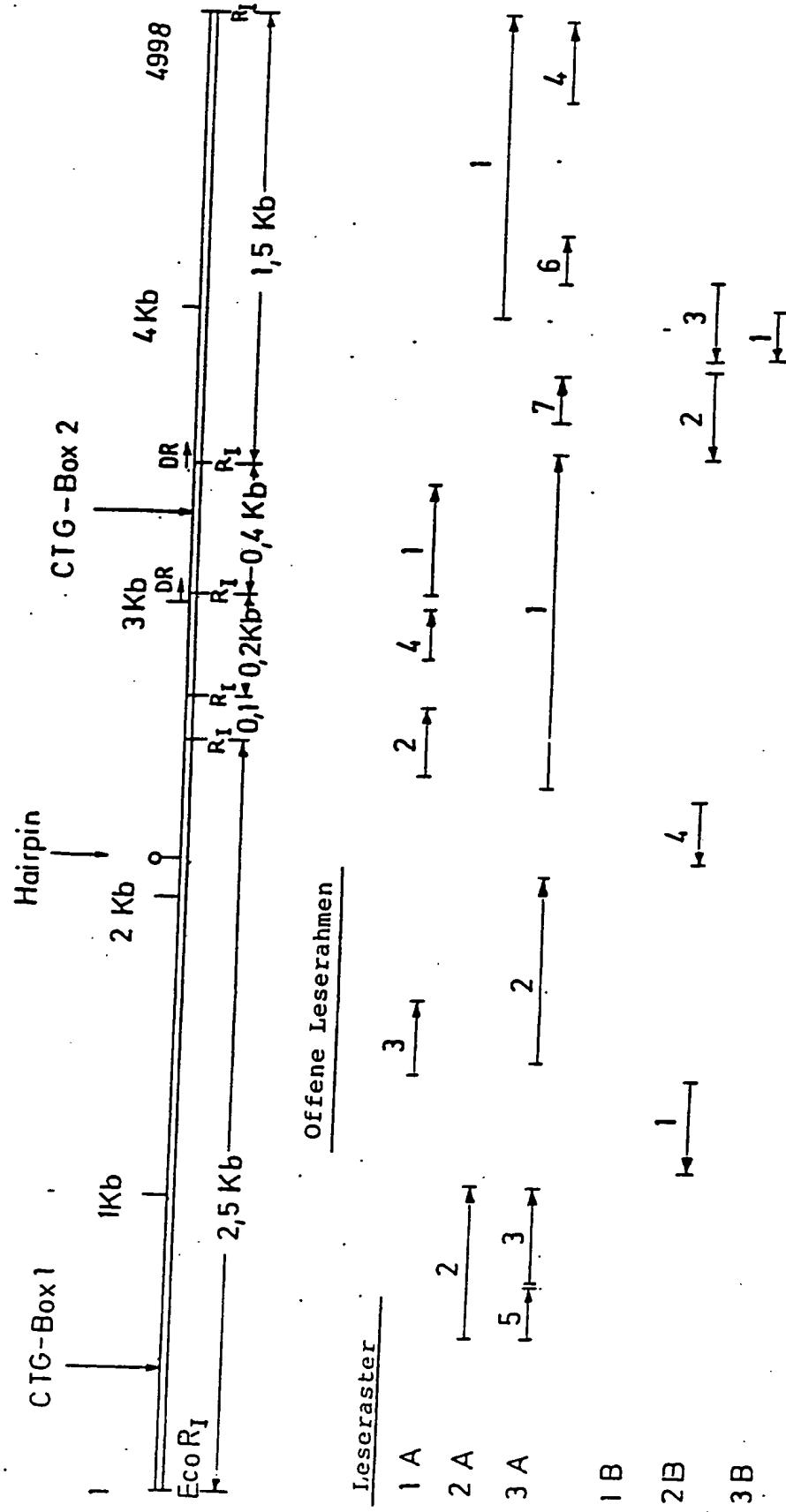
4|13

1	3130	3140	3150	3160	3170	3180
	ATCGTTACGG	AAATGATACT	CTTCTCCCTG	ACGGCTGGGA	AGATATGCAG	TTCGGTACTG
	TAGCAATGCC	TTTACTATGA	GAAGAGGGAC	TGCCGACOCT	TCTATAOGTC	AAGCAATGAC
	3190	3200	3210	3220	3230	3240
	ATATCGAACG	TOGCAACATT	CAGTTTACTA	AGGGTTTATT	TCGTCCCCCT	AGTAATGACC
5	TATAGCTTCG	AGCGTTGTA	GTCAAATGAT	TCCCCAAATAA	AGCAGGGAA	TCAATTACTGG
	3250	3260	3270	3280	3290	3300
	TIGCTCPAAA	GTTTCCTGTT	TCTATCCATA	CTGAAGAACAA	AAAAATGTCT	TATGTTGCTA
	AACCGAGTTT	CAAAAGACAA	AGATAGGTAT	GACITCTTGT	TTTTACAGA	ATACAACGAT
	3310	3320	3330	3340	3350	3360
	ATACCTTGG	TCATGTTATC	ATTGATATTT	TGCTTTATCG	TCTTGAGCTG	CTTTTCTCTG
	TATGGAAACC	AGTAGCATAG	TAACTATAAA	ACGAAATAGC	AGGACTCGAC	AAAAGGAGC
	3370	3380	3390	3400	3410	3420
10	CTTGTGCAA	GTGGGAGGAG	TTTATAATG	AGTGTCTTCC	GTTCCTCTCT	CTGGCGCTGA
	GAACAAACGTT	CACCCCTCGTC	AAAATATTAC	TCACAGAAGG	CAAGAGAGGA	GACCGCGACT
	3430	3440	3450	3460	3470	3480
	CTCAAGTAGT	CGCTCAGTTC	TCTGAGTCCT	CCCGCATTGC	CGTTGAGGAA	TTCGGTGAAG
	GAGTTCATCA	GGAGGTCAAG	AGACTCAGAA	GGGCGTAACG	GCAACTCCCT	AAGGCACTTC
	3490	3500	3510	3520	3530	3540
	TIGCTGATGA	CCCCCTCTCCC	TTTAGTGAAG	ATGGGTTTGA	TGATATATCT	TTATTCCTGAT
	AACGACTACT	GGGGAGAGGG	AAATCACCTC	TACCCAAACT	ACTATATAGA	AAIAAGACTA
15	3550	3560	3570	3580	3590	3600
	GAAAGGATTG	TTCCCTTGTG	AAAGTTACTG	TAGTTGGTAA	GTCCCACCGC	GCTGGTACAT
	CTTCTCTAAC	AACGAAACAC	TTCAATGAC	ATCAACCATT	CAGGGTGGCG	CGACCATGTA
	3610	3620	3630	3640	3650	3660
	CTAACAGGG	CAAAGACTAT	GATTTTCTA	CCTCATGGC	CGAATAATTG	ATGGCGTCAA
	GATTCGTCCTC	GTTCCTGATA	CTAAAAAGAT	GAGAGTACCG	GCTTATAAGC	TACGGCACGTT
	3670	3680	3690	3700	3710	3720
20	ATGATGACAA	TGATGGCGTG	CAGGTGATA	GAATCAATGT	TGACGCTCCG	ATGATGGCGT
	TACTACTGT	ACTACCGCAG	GTCCAACAT	CTTGTGATA	ACTGGCAGCG	TACTACGGCA
	3730	3740	3750	3760	3770	3780
	ATGCCCTCAT	TGTCGGTGGC	GCTACGTATG	ACCTTGACTT	TGACCGTAAC	GGATACTCTC
	TACCCGAGTA	ACAGCAACCG	CGATGCATAC	TGGAACGTAA	ACTGGCATTG	CCTATAGAAG
	3790	3800	3810	3820	3830	3840
	TCGGPAATTGA	GGAAAGTCTAA	CTCCCCTTGT	TCAAACCTAA	ATTTCACTTC	CTATGGGAGA
25	AGCCCTAACT	CTTCAGATT	GAGGGAAACA	AGTTTGGATT	TAAAGTAAAG	GATAACCTCT
	3850	3860	3870	3880	3890	3900
	GCGGTTGCGC	GCTCTCACAT	GGGGGGTAG	TGCAATGGTC	GCATGTCACT	CTCTGAAGGT
	CGCCAAGCGG	CGAGAGGTGA	CCGCCCCATC	ACGTTACCAAG	CGTACAGTGA	GAGACTTCCA
	3910	3920	3930	3940	3950	3960
	GAAGCTGCTG	GTTCGAATCC	AGACCCCGCA	ACCRRAAACGG	ATTTGACCTC	CGTTATTGCA
	CTTCGACGAC	CAAGCTTACG	TCTGGGGCGT	TGGTTTGCC	AAAATCGGAG	GCAATAAGCT
	3970	3980	3990	4000	4010	4020
30	TGTCGGAAA	GGTGGTGGCG	AAGTGTGAA	AAAGCATCGG	TGTTTTTATA	ACGGTTTCCG
	ACAGCGCTTT	CCACCCACCG	TTCACACTT	TTTCGTAGCC	ACAAAAATAT	TCCGAAAGCG
	4030	4040	4050	4060	4070	4080
	CGCCCTCTC	GGGTCTTGT	TGTTTTCTT	TCCTTGTGT	ACTCCTTGT	TTGGCTGGATT
	GCGGGGAGAG	CGCGAGAACT	ACCAAAGRAA	AAGGAACACA	TGAGGAACRA	AACGACCTAA
	4090	4100	4110	4120	4130	4140
	TGACTCTGAA	GCTCATATGC	CTCTCTGGA	TGTTTTCTAT	ACTCCTCTG	GTTCATGGTT
35	ACTGAGCTT	CGACTATACG	GTAGAACTT	ACTAAAGATA	TGAGTAGTAC	CAAGTACCA
	4150	4160	4170	4180	4190	4200
	TGTTTCCCGT	AGTCCTACTA	TTTCTGCTT	TCCTTTTAT	GAGTTCTT	GCTCTCTAT
	ACGAAACCGA	TCACCGATCAT	AAAGACCGA	ACGGAAATA	CTCAGCGA	CGAGGGATA

5|13

1	4210	4220	4230	4240	4250	4260
	TACTGTTTCT	GGCACTACIT	ATTCTCTGCC	TTATTCGGIT	TCTTATTCTA	CTAATGGCIT
	ATGACAAAGA	CGGTGAAGAA	TAAGAGACCG	AATAAGCCAA	AGAATAAGAT	GATTACCAA
	4270	4280	4290	4300	4310	4320
	TGATGTTTCT	TATTTAGCTA	ACGATTCTGG	CAAATCTTAT	GATTATGCTT	GCGCTTTTCC
5	ACTACAAAGA	ATAAAATCGAT	TCCTAAGACC	GTTTAGAATA	CTAATACGAA	CGCGAAAAGG
	4330	4340	4350	4360	4370	4380
	TCTTCCCTCT	CGTGGTGCIT	CIGGGTATIG	GTATGAACTA	CCTTCITTC	CTATTGGITC
	AGAAGGAGAA	GCACCAAGAA	GACCAATAAC	CATACTTGAT	GGAAAGAAAGG	GATAACCAAG
	4390	4400	4410	4420	4430	4440
	GGGAATGAAG	TTTGATAACGT	GCTCTGTCG	CGTTTATCT	ACCGCTGCTC	AACCTCTTGG
	CCCTTACTTC	AAACTATGCA	CGAGACAAGC	GCAAATAAGA	TGGCGACGAG	TTGGAAAGACC
10	4450	4460	4470	4480	4490	4500
	GACTTATGGT	TTTTTAACIT	CITCCCTTATG	TCGCTCAGAC	CGCATCTT	CITTCGGTAA
	CINGAATACCA	AAAAATTGAA	GAAGGAAATC	AGCGAGTCIG	GGGTAAGAAA	GAAAGCCATT
	4510	4520	4530	4540	4550	4560
	CACTGCTCT	TCITCTCTC	GPTCCTCTAC	TGATACCTTA	GATTCTTTA	GTTCCTTCTTC
	GTGACGGAGA	AGAAGAACAC	CAAGAAGATG	ACTATGAAAT	CTAAGAAAAT	CAAAAAGAAG
	4570	4580	4590	4600	4610	4620
	TCCCTTTAT	TCGTATCCTT	TTGCAATTG	TTCTACTTCT	TCITCTCCG	CAAGTGGITA
15	AGGAAAAATA	ACCATAGGAA	AACGTTAAGC	AAGATGAAGA	AGAAGAAGGC	GTTCACCAAT
	4630	4640	4650	4660	4670	4680
	TGTTTACAG	GGTCGGTACA	ATAATTITAT	TATTCCTTCG	CCTGGCTATT	CGAGTACCCG
	ACAAAATGTC	CCACCACIGT	TATTAATAA	ATAAGGAAGC	GGACCGATAA	GCTCATGGGC
	4690	4700	4710	4720	4730	4740
	TGCTTGAAT	CITGGGTGTTA	CICGTTATCT	TCGGGGAACT	AATGCTTTTG	TCCTTATCC
	ACGAAACTTA	GAACCACAAT	GAGCAATAGA	AGCGCCITGA	TTACGAAAAC	AGGAAATAGG
20	4750	4760	4770	4780	4790	4800
	GTCTGGATAC	ACTATCCCT	CITCTGATAT	CGGTTTGTGTT	TTTGTTCAGC	ACCCATCTTC
	CAGACCTATG	TGATAGGGAA	GAAGACTATA	GCCAAAACAA	AAACAAGTCG	TCGGTAGAAG
	4810	4820	4830	4840	4850	4860
	TTCCTCTGTT	TAITCTGCTT	CTGCCCTTGA	TACTACAGGT	TCTTTCGCTT	TTTCTCTCTC
	AAGAGGACAA	ATAAGACGAA	GACGGAAACT	ATGATGTCCA	AGAAAGCGAA	AAAGAGAAGA
	4870	4880	4890	4900	4910	4920
25	TGTTCTGCT	TCTCGCTCTC	CTGACGTTAA	GCTTGGTGAC	TGGCTGTCG	ATTCTCCGGA
	ACAGGGACGA	AGAGCGAGG	GACTGCAATT	CGAACCACTG	ACCGACAGGC	TAAGAGGCCT
	4930	4940	4950	4960	4970	4980
	GGATTGCAA	GATGCTATTAA	CCATGAAATT	TGGAGTTGAT	TCCGGTACTC	TTAAAGACTC
	CCTAAACGTT	CTACGATAAT	GGTTACTTAA	ACCTCAACTA	AGGCCATGAG	AATTCTGAG
	4990					
	TAAGGATAAC	TTGAATT	3'			
	ATTCCTT	TTG	AACTTAAG	5'		

6/13



7 | 13

SEQUENCE ID: N8 - pUC19

**OPTIONS:**  
PLUS STRAND  
ALL  
START ATG → NOT OPENFRAME  
ONE LETTER CODE

5'1 TGGAGTCGTACTGATATCGAAGCTCGAACATTAGCTTACATAAGGTATTGCTCCCTTGTGAT  
 C S S L L I S K L A T F S L L R F I C S P \* \* \* 1  
 A V R Y \* Y R S S Q H S V Y \* G L F A P L S N 2  
 Q F V T D I E A R N I Q F T K V Y L L P L V (M) 3  
  
 71 GACCTGGCTCAAGGTTCTGGTCTATCATCTAGAGAACAAAGATGCTATGTGCTTAATCT  
 P C S K V F C F Y P Y \* R T K N V L C C \* Y L 1  
 D L A Q K F S V S I H T E E Q K (M) S Y V A N T F 2  
 T L L K S F L F L S I L K N K K C L (M) L L I P 3  
  
 141 TTGGCATCGTATCATGATATTGCTTATGCTGGCTGCCTTTCCTCCCTTGGAAGTGGGA  
 W S S Y H \* Y F A L S S \* A A F P R L L Q V G 1  
 G H R I I D I L L Y R P E L L F L A C C K W E 2  
 L V I V S L I F C F I V L S C F S S L V A S G S 3  
  
 211 GCGTTTATATGAGTCGTCTCCGGTCCTCTGGCTGACTCAAGTAGTGGCTCTCTGAG  
 A V L \* \* V S S V L S S G A D S S S R S V L \* V 1  
 Q F Y N E C L P F S P L A L T Q V V A Q F S E 2  
 S F I (M) S V F R S L L W R \* L K \* S L S S L S 3  
  
 281 TCTTCCCCATTGGCGTGTGAG  
 F P II C R \* 1  
 S S P I A V E 2  
 L P P L P L 3 2

ERSATZBLATT

88  
13

10

15

20

25

30

35

SEQUENCE ID: N8 - pUC19

OPTIONS:  
 MINUS STRAND  
 ALL  
 START ATG    NOT OPEN FRAME  
 ONE LETTER CODE

301 CTCAGGGCAATGGGAAACTCGAGAACTTGACCTGAGTCAGCCGACTTGTGAGTCAGGCCAGGGAGAAAGGA  
 L N G N G G R L R E L S D Y L S Q R Q R R E R K  
 S T A (M) G E D S E N \* A T T \* V S A R G E N G  
 Q R Q W G K T Q R T E R L L E S A P E E R T E  
 1 2 3

231 AGACACTCATTATAAACCTGCTCCACTTGAAACAGCCAGGAAAAGCAGCTCAGGACGTTAAGGAAAAA  
 T L I I K L L P L A T S E E K Q L R T I K Q N  
 R H S L \* N C S H L Q Q A R K S S S G R \* S K I  
 D T H Y K T A P T C N K R G K A A Q D D K A K  
 1 2 3

161 TATCATATGATGACGATGACCAAAGGTATTAGCAACATAAGACATTTTGCTCTCAGTTTCGTTGCTACAC  
 I N D T N T K G I S N I R H F L F F S (N) D R N  
 S (M) I R \* P K V L A T \* D I F C S S V W I E T  
 Y Q \* Y D D Q R Y \* Q H K T F F V L Q Y G \* K Q  
 1 2 3

91 AGAAACTTTCAGGCAAGGTCAATTACTTAAGGGAGCAAAATTAACCTTAGTAACTGAATGTTGCGACCTT  
 R K L L S K V I T K G S K \* T L V N \* (M) L R A S  
 E N F \* A R S L L R G A N K P \* T E C C E L  
 K T F E Q G H Y \* G E Q I N L S K L N V A S F  
 1 2 3

21 CGATATCAGTAAGAACTCCA  
 I S V ' T N C  
 R Y Q \* R T A  
 D I S N E L

9/13

## 1 \*\*\* INITIATION/TERMINATION REFERENCE \*\*\*

6/5.1

INITIATION POSITION												TERMINATION POSITION												
												***** FRAME 1 *****												
5	157	311	433	1060	1309	1435	19	25	139	151	286	481												
	1483	1669	1729	2059	2377	2383	487	517	526	556	601	613												
	2428	2479	2620	2719	2782	2839	667	676	721	742	745	778												
	2971	2992	3046	3133	3235	3292	787	796	799	853	883	898												
	3388	3487	3511	3520	3619	3661	1030	1171	1183	1195	1276	1339												
	3664	3670	3673	3697	3721	3748	1408	1675	1735	1819	1825	2035												
	3859	3883	4135				2044	2053	2125	2278	2287	2365												
10							2404	2665	2728	2788	3004	3022												
							3418	3427	3559	3571	3712	3868												
							4009	4081	4087	4093	4111	4150												
							4180	4252	4261	4279	4300	4354												
							4393	4468	4498	4531	4549	4636												
							4642	4720	4765	4828	4882	4888												
							4897	4945	4957	4972	4981	4987												
15	TOTAL : 39												TOTAL : 84											

INITIATION POSITION												TERMINATION POSITION												
												***** FRAME 2 *****												
20	131	539	593	815	1052	1202	158	266	440	443	1058	1259												
	1205	3539	3833	3875	3986	4040	1301	1310	1433	1529	1574	1613												
	4097	4385					1616	1631	1634	1649	1670	1709												
							1727	1730	1751	1757	1763	1778												
							1853	1856	1868	1877	1982	2009												
							2060	2258	2372	2384	2417	2423												
							2444	2495	2519	2528	2567	2573												
							2627	2705	2717	2747	2783	2792												
							2810	2843	2903	2906	2924	2951												
							2969	2972	2993	3047	3086	3089												
							3110	3134	3149	3179	3209	3230												
							3233	3236	3272	3299	3323	3344												
25							3386	3389	3443	3464	3476	3485												
							3488	3503	3506	3518	3521	3578												
							3602	3620	3662	3665	3671	3686												
							3689	3701	3749	3755	3761	3767												
							3788	3818	3944															
	TOTAL : 14												TOTAL : 99											

INITIATION POSITION												TERMINATION POSITION												
												***** FRAME 3 *****												
30	27	282	483	522	555	693	75	168	189	253	447	540												
	741	744	774	930	1194	1275	732	1053	1203	1206	1401	1458												
	1287	1476	1599	1656	1770	1800	2097	2133	2193	2313	2331	2343												
	1845	1947	2292	2403	2667	2727	3537	3540	3798	3894	3900	3984												
	2787	2826	2997	3165	3285	3636	3987	4038	4275	4386	4455	4539												
	3651	3711	3714	3960	4110	4128	4686	4992																
	4179	4254	4263	4299	4305	4353																		
35	4446	4620	4722	4932	4944																			
	TOTAL : 47												TOTAL : 32											

10 | 13

## \*\*\* MOLECULAR WEIGHT \*\*\*

6/5.2

1

	START	END	MOLECULAR WEIGHT	NO.	START	END	MOLECULAR WEIGHT
***** FRAME 1 *****							
5	157	286	4842.59	1	3046	3418	13607.00
	331	481	5857.77	2	3133	3418	10646.71
	433	481	1911.04	3	2428	2665	9020.45
	1060	1171	4219.95	4	1435	1675	8907.70
	1309	1339	1055.14	5	2479	2665	7032.09
	1435	1675	8907.70	6	1483	1675	6959.42
	1483	1675	6959.42	7	3235	3418	6919.29
	1669	1675	262.36	8	2839	3004	6213.38
10	1729	1735	305.39	9	331	481	5857.77
	2059	2125	2514.97	10	3721	3868	5519.15
	2377	2404	1011.23	11	157	286	4842.59
	2383	2404	750.93	12	3883	4009	4697.94
	2428	2665	9020.45	13	3292	3418	4696.55
	2479	2665	7032.09	14	3748	3868	4490.94
	2620	2665	1563.81	15	1060	1171	4219.95
	2719	2728	375.51	16	3619	3712	3648.43
15	2782	2788	305.39	17	3487	3559	2767.29
	2839	3004	6213.38	18	2059	2125	2514.97
	2971	3004	1408.75	19	3661	3712	1946.41
	2992	3004	578.66	20	433	481	1911.04
	3046	3418	13607.00	21	3511	3559	1887.18
	3133	3418	10646.71	22	3664	3712	1815.22
	3235	3418	6919.29	23	3520	3559	1585.79
	3292	3418	4696.55	24	3670	3712	1582.93
20	3388	3418	1294.51	25	2620	2665	1563.81
	3487	3559	2767.29	26	3673	3712	1451.74
	3511	3559	1887.18	27	2971	3004	1408.75
	3520	3559	1585.79	28	3388	3418	1294.51
	3619	3712	3648.43	29	1309	1339	1055.14
	3661	3712	1946.41	30	2377	2404	1011.23
	3664	3712	1815.22	31	2383	2404	750.93
25	3670	3712	1582.93	32	2992	3004	578.66
	3673	3712	1451.74	33	3697	3712	547.68
	3697	3712	547.68	34	4135	4150	535.70
	3721	3868	5519.15	35	2719	2728	375.51
	3748	3868	4490.94	36	1729	1735	305.39
	3859	3868	277.33	37	2782	2788	305.39
	3883	4009	4697.94	38	3859	3868	277.33
	4135	4150	535.70	39	1669	1675	262.36
***** FRAME 2 *****							
30	131	158	1002.19	1	539	1058	19095.03
	539	1058	19095.03	2	593	1058	17110.92
	593	1058	17110.92	3	815	1058	9231.94
	815	1053	9231.94	4	3833	3944	4193.88
	1052	1058	236.23	5	3875	3944	2659.22
35	1202	1259	2324.59	6	1202	1259	2324.59
	1205	1259	2193.40	7	1205	1259	2193.40
	3533	3573	1531.73	8	3533	3576	1531.73
	3822	3944	4193.63	9	131	158	1002.19
	3875	3944	2659.22	10	1052	1058	236.28

11/13

6/5.3

1

		*****	FRAME	3	*****	
5	27	75	1815.23	1	2403	3537
	282	447	5855.63	2	2667	3537
	483	540	2003.43	3	2727	3537
	522	540	616.78	4	2787	3537
	555	732	7063.49	5	2826	3537
	693	732	1636.98	6	1476	2097
	741	1053	11799.97	7	2997	3537
	744	1053	11668.78	8	1599	2097
	774	1053	10510.39	9	1656	2097
	930	1053	4670.61	10	3165	3537
10	1194	1203	334.43	11	1770	2097
	1275	1401	4929.75	12	741	1053
	1287	1401	4398.11	13	744	1053
	1476	2097	24121.86	14	1800	2097
	1599	2097	19440.48	15	774	1053
	1656	2097	17213.04	16	4722	4992
	1770	2097	12848.35	17	1845	2097
	1800	2097	11612.94	18	3285	3537
	1845	2097	9839.93	19	555	732
	1947	2097	5672.19	20	4110	4275
15	2292	2313	766.90	21	3636	3798
	2403	3537	43550.02	22	282	447
	2667	3537	34028.78	23	4128	4275
	2727	3537	31646.22	24	1947	2097
	2787	3537	29263.59	25	3651	3798
	2826	3537	27663.74	26	1275	1401
	2997	3537	21162.74	27	930	1053
	3165	3537	14339.49	28	1287	1401
	3285	3537	9689.43	29	4179	4275
	3636	3798	6115.51	30	4299	4386
20	3651	3798	5533.90	31	3711	3798
	3711	3798	3278.61	32	3714	3798
	3714	3798	3147.42	33	4305	4386
	3960	3984	918.13	34	4620	4686
	4110	4275	6361.00	35	4932	4992
	4128	4275	5690.14	36	483	540
	4179	4275	3784.82	37	4944	4992
	4254	4275	923.20	38	27	75
	4263	4275	522.68	39	693	732
	4299	4386	3385.17	40	4353	4386
25	4305	4386	3140.83	41	4254	4275
	4353	4386	1350.57	42	3960	3984
	4446	4455	1350.57	43	2292	2313
	4620	4686	395.51	44	522	540
	4722	4992	2646.26	45	4263	4275
	4932	4992	10224.42	46	4446	4455
	4944	4992	2321.86	47	1194	1203
			1667.26			334.43

12 | 13

6/6.1

## I. \*\*\* INITIATION/TERMINATION REFERENCE \*\*\*

	INITIATION POSITION			TERMINATION POSITION					
				***** FRAME 1 *****					
5	514 1399 3946			187	211	262	292	331	379
				430	553	568	583	652	694
				700	727	754	766	778	820
				871	874	880	991	1111	1180
				1186	1255	1270	1303	1363	1369
				1396	1432	1495	1678	1699	1735
				1768	1789	1792	1822	1987	2014
10				2146	2173	2233	2272	2356	2425
				2431	2479	2536	2566	2581	2626
				2647	2812	2920	2923	2977	2989
				3016	3052	3076	3202	3229	3235
				3247	3274	3280	3355	3367	3424
				3505	3523	3544	3565	3649	3652
				3700	3718	3730	3760	3769	3778
				3805	3808	3922	3928	3940	4042
15				4069	4078	4087	4102	4123	4258
				4306	4438	4495	4621	4657	4675
				4684	4816				
	TOTAL : 3			TOTAL : 104					
				***** FRAME 2 *****					
20	203	863	896	1115	1139	1172	17	26	59
	1685	1730	2378	2495	2621	2642	245	278	299
	3569	3875	4427	4778			449	470	530
							746	749	782
							842	1142	1166
							2261	2393	2498
							3323	3530	3881
							3986	4034	4049
25							4184	4187	4190
							4220	4334	4397
							4532	4535	4538
	TOTAL : 16			TOTAL : 66					
				***** FRAME 3 *****					
30	870	873	1002	1269	1287	1362	372	459	522
	1542	1677	1800	2172	2646	3114	864	1044	1173
	3153	3639	3675	3699	3816	4716	1575	1614	1662
							1797	1872	1896
							2019	2097	2139
							2307	2319	2379
							2643	2667	2865
							3183	3330	3351
35							3516	3540	3597
							3786	3876	4266
							4821	4923	
	TOTAL : 18			TOTAL : 62					

13|13

1 \*\*\* MOLECULAR WEIGHT \*\*\*

6/6.2

	START	END	MOLECULAR WEIGHT	NO.	START	END	MOLECULAR WEIGHT
***** FRAME 1 *****							
5	514	553	1629.87	1	3946	4042	3550.03
	1399	1432	1344.47	2	514	553	1629.87
	3946	4042	3550.03	3	1399	1432	1344.47
***** FRAME 2 *****							
10	203	245	1707.87	1	3569	3881	11635.17
	863	1142	10853.68	2	1172	1466	11262.47
	896	1142	9431.19	3	863	1142	10853.68
	1115	1142	1115.33	4	896	1142	9431.19
	1139	1142	149.21	5	2621	2837	7747.28
	1172	1466	11262.47	6	2642	2837	6866.30
	1685	1781	3768.36	7	1685	1781	3768.36
	1730	1781	1988.33	8	4778	4859	3218.74
	2378	2393	656.78	9	1730	1781	1988.33
	2495	2498	149.21	10	203	245	1707.87
15	2621	2837	7747.28	11	1115	1142	1115.33
	2642	2837	6866.30	12	2378	2393	656.78
	3569	3881	11635.17	13	3875	3881	277.38
	3875	3881	277.38	14	4427	4433	246.32
	4427	4433	246.32	15	1139	1142	149.21
	4778	4859	3218.74	16	2495	2498	149.21
***** FRAME 3 *****							
20	870	1044	6984.76	1	870	1044	6984.76
	873	1044	6853.57	2	873	1044	6853.57
	1002	1044	1764.94	3	1269	1380	4059.50
	1269	1380	4059.50	4	1287	1380	3436.80
	1287	1380	3436.80	5	2172	2244	2682.96
	1362	1380	748.87	6	4716	4779	2652.92
	1542	1563	879.86	7	1800	1872	2593.86
	1677	1686	418.54	8	3816	3876	2182.40
	1800	1872	2593.86	9	3114	3159	1826.12
	2172	2244	2682.96	10	1002	1044	1764.94
	2646	2667	838.92	11	3639	3681	1629.97
	3114	3159	1826.12	12	1542	1563	879.86
	3153	3159	248.34	13	2646	2667	838.92
	3639	3681	1629.97	14	1362	1380	748.87
	3675	3681	206.26	15	1677	1686	418.54
30	3699	3705	236.28	16	3153	3159	248.34
	3816	3876	2182.40	17	3699	3705	236.28
	4716	4779	2652.92	18	3675	3681	206.26

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP88/00123

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>4</sup>

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl<sup>4</sup>: C 12 N 15/00;A 61 K 39/29;C 12 Q 1/68;G 01 N 33/576

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl <sup>4</sup>	C 12 N;A 61 K

Documentation Searched other than Minimum Documentation  
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup>

Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	WO,A,84/01107 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) 29 March 1984, see the whole document --	1-10
X	EP,A,0124896 (SEELIG) 14 November 1984, see example 7 --	7
A	EP,A,0066296 (EISAI CO.LTD) 08 December 1982 --	
A	WO,A,82/03330 (TREPO) 14 October 1982 --	
A	La Recherche, Vol.14, No.145, June 1983 (Paris FR) A.Zotov: "Les hépatites", pages 874-865 --	
P,A	EP,A,0242300 (INSTITUT PASTEUR) 21 October 1987 -----	

<sup>\*</sup> Special categories of cited documents: <sup>10</sup><sup>"A"</sup> document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<sup>"E"</sup> earlier document but published on or after the international filing date<sup>"L"</sup> document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<sup>"O"</sup> document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<sup>"P"</sup> document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<sup>"T"</sup> later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<sup>"X"</sup> document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step<sup>"Y"</sup> document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<sup>"&"</sup> document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

Date of Mailing of this International Search Report

29 April 1988 (29.04.88)

01 June 1988 (01.06.88)

International Searching Authority

Signature of Authorized Officer

European Patent Office

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

EP 8800123

SA 20814

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 24/05/88. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A- 8401107	29-03-84	EP-A-	0119259	26-09-84
		CA-A-	1189878	02-07-85
EP-A- 0124896	14-11-84	WO-A-	8404326	08-11-84
		DE-A-	3316464	08-11-84
		AU-A-	2865084	19-11-84
		JP-T-	60501241	08-08-85
EP-A- 0066296	08-12-82	JP-A-	57198867	06-12-82
		CA-A-	1184846	02-04-85
WO-A- 8203330	14-10-82	FR-A, B	2502154	24-09-82
		EP-A, B	0074986	30-03-83
EP-A- 0242300	21-10-87	FR-A-	2597606	23-10-87
		JP-A-	62249999	30-10-87

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 88/00123

<b>I. KLASSEKIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup>		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int Cl. 4 C 12 N 15/00; A 61 K 39/29; C 12 Q 1/68; G 01 N 33/576		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBiete</b>		
Recherchierte Mindestprüfstoff <sup>7</sup>		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int. Cl. 4	C 12 N; A 61 K	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup></b>		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
X	WO, A, 84/01107 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) 29. März 1984, siehe das ganze Dokument --	1-10
X	EP, A, 0124896 (SEELIG) 14. November 1984, siehe Beispiel 7 --	7.
A	EP, A, 0066296 (EISAI CO. LTD) 8. Dezember 1982 --	
A	WO, A, 82/03330 (TREPO) 14. Oktober 1982 --	
A	La Recherche, Band 14, Nr. 145, Juni 1983 (Paris, FR), A. Zotov: "Les hépatites", Seiten 874-865 --	
P,A	EP, A, 0242300 (INSTITUT PASTEUR) 21. Oktober 1987 -----	
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:      "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist      "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist      "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)      "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht      "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist      "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden      "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist      "&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
29. April 1988	01.06.88	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des beauftragten Bediensteten	
Europäisches Patentamt	P.C.G. VAN DER PUTTEN	

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 8800123  
SA 20814

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentsfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 24/05/88.  
Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentsfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A- 8401107	29-03-84	EP-A- 0119259 CA-A- 1189878	26-09-84 02-07-85
EP-A- 0124896	14-11-84	WO-A- 8404326 DE-A- 3316464 AU-A- 2865084 JP-T- 60501241	08-11-84 08-11-84 19-11-84 08-08-85
EP-A- 0066296	08-12-82	JP-A- 57198867 CA-A- 1184846	06-12-82 02-04-85
WO-A- 8203330	14-10-82	FR-A, B 2502154 EP-A, B 0074986	24-09-82 30-03-83
EP-A- 0242300	21-10-87	FR-A- 2597606 JP-A- 62249999	23-10-87 30-10-87